

From the Møls Laboratory, Fæmøller, Denmark, and the Institute of Genetics,
University of Copenhagen

A COMPARATIVE CYTOLOGICAL INVESTIGATION OF THE
REPRODUCTIVE CYCLE OF AN AMPHIMICTIC DIPLOID AND
A PARTHENOGENETIC TRIPLOID FORM OF *LUMBRICILLUS*
LINEATUS (O.F.M.) (OLIGOCHAETA, ENCHYTRAEDIAE)

By

B. CHRISTENSEN

With 19 Figures in the Text

(Received April 8, 1960)

Introduction

Several cases of parthenogenesis among the oligochaete earthworms have recently been published by MULDAL (1952) and OMODEO (1951a, b and 1952). In a preliminary survey of chromosome numbers in enchytraeids (CHRISTENSEN and NIELSEN, 1955) several cytological facts are presented which suggest that parthenogenesis may also occur in this family. It is the purpose of the present paper to show that parthenogenesis has now been firmly established in a triploid form of the diploid amphimictic *Lumbricillus lineatus* (O.F.M.) in which a cytological investigation has revealed a new mechanism for the restoration of the somatic chromosome number.

In a previous publication (CHRISTENSEN and O'CONNOR, 1958) it was already shown that the diploid amphimictic and the triploid parthenogenetic cytotypes of *L. lineatus* copulate, and that activation by spermatozoa from the diploid type is necessary for the normal development of the eggs of the triploid. The term "obligatory co-existence" was proposed to describe this relationship. In this report, the diploid amphimictic cytotype will be referred to as *L. lineatus* 2x and the triploid parthenogenetic cytotype as *L. lineatus* 3x.

Material and methods

Lumbricillus lineatus s. l. is a littoral species. Both cytotypes occur together in varying ratios in wrack beds; they are especially abundant in partly decomposed seaweeds. Samples have been obtained from Rønnerne, Frederikshavn (leg. B. Overgaard Nielsen); Avedøre, south of Copenhagen (leg. N. C. Røjle); Fæmøller Strand, near the Møls Laboratory, and Menai Strait, near Bangor, N. Wales.

The worms are hermaphrodites, but the triploid cytotype does not produce mature spermatozoa. During copulation the ventral surfaces of the partners are opposed with anterior ends pointing in opposite directions. The two penes of one worm are inserted into the spermathecae of the other and reciprocal transfer of sperm

takes place. If one of the conjugants is a triploid, which produce no sperm, and the other a diploid worm, only the latter will transfer sperm. Eggs are laid in cocoons secreted by the clitellum. The cocoon travels towards the anterior end of the worm and the eggs are fertilized as they pass the spermathecae.

Both cytotypes are described in NIELSEN and CHRISTENSEN (1959), cf. also CHRISTENSEN and O'CONNOR (1958).

Worms are kept in special breeding chambers which permit direct observation under the dissecting microscope (CHRISTENSEN, 1956). By inspecting these chambers at regular intervals it is possible to obtain cocoons of known age. The cytological observations were based partly upon eggs obtained in this way and partly upon eggs dissected from the worms.

For blastomere mitoses the orcein-squash method has been used. For all other stages the following procedure was applied: 1. Fixation: A live worm is placed on the slide in a drop of water and cut through at the clitellum. If a gentle pressure is applied the eggs can be extruded, and the remains of the worm are removed. The egg membrane is punctured, permitting the egg content to flow out. As water evaporates the yolk and the nucleus flatten and stick to the slide. A glass ring, 8 mm by 15 mm in diameter, is placed over the preparation. This is filled with Carnoy's fluid (abs. alcohol:acetic acid, 3:1) and left for about one hour. Eggs obtained by rupturing a cocoon are treated in the same way except that they are not punctured before drying. 2. Washing: distilled water, once. 3. HCl Hydrolysis: 1 N HCl for 6 minutes. 4. Washing: distilled water, once. 5. Staining: Feulgen fuchsin for one hour. 6. Washing: distilled water, twice. 7. Dehydration: 50 per cent alcohol — 96 per cent alcohol — abs. alcohol (twice) — xylol (twice) — mounting in Canada balsam.

Cytological observations

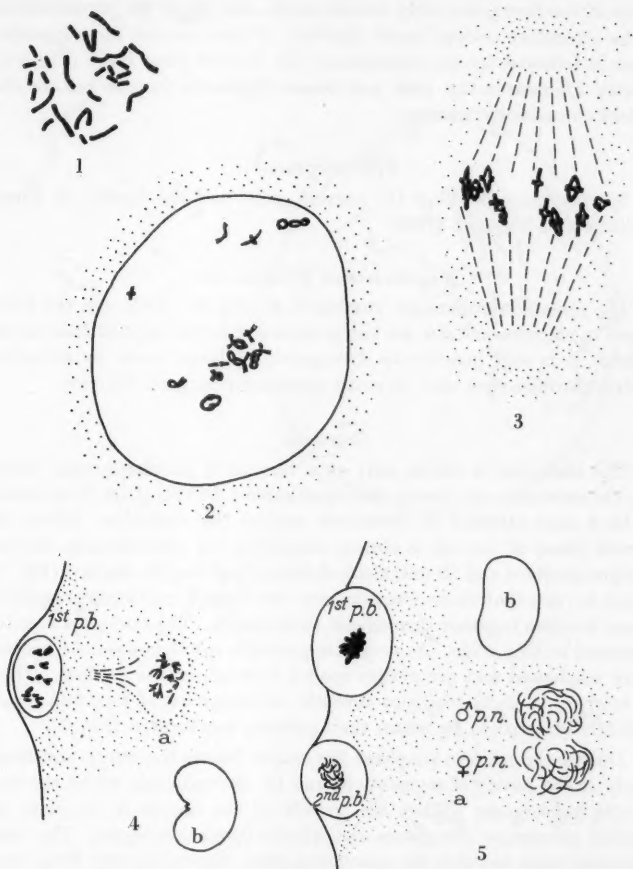
Lumbricillus lineatus 2x

The diploid chromosome number is 26. In the somatic cells 10 large metacentric chromosomes and 16 small apparently acrocentric chromosomes are seen at mitotic metaphase (Fig. 1).

Oogenesis

When the growth of the eggs is nearly complete the chromosomes of the oocyte become Feulgen-positive at the diplotene stage, and 13 typical bivalents are seen (Fig. 2). Chiasmata appear as series of loops along some of the larger chromosomes while the smaller bivalents are already fully terminalized. At the end of diakinesis, bivalents are only slightly more condensed than in the diplotene stage (Fig. 3). In the present species, as in the majority of amphimictic *Enchytraeidae*, the MI persists until the eggs leave the worms. The duration of the MI stage depends upon environmental conditions; during winter it may last for several months.

Following fertilization meiosis proceeds in the cocoons and the chromosomes enter first meiotic anaphase, followed by the extrusion of the first polar body (Fig. 4a). At this time the egg becomes kidney-shaped (Fig. 4b), due to an indentation which appears on one side. The first



Figs. 1—5. *Lumbricillus lineatus* 2x. Fig. 2 and 3 show the nucleus in the egg before deposition, Fig. 4 and 5 the egg after deposition. a: the nuclei, b: the entire egg as seen under the dissecting microscope, schematically. 1: spermatogonial metaphase, $\times 1100$, 2: oocyte prophase, $\times 700$, 3: first meiotic metaphase in the egg, $\times 700$, 4 a: extrusion of the first polar body from the egg, $\times 700$, b: indentation of the egg membrane, 5a: both polar bodies are extruded, fusion of the pronuclei about to take place, $\times 700$, b: the egg has assumed its normal shape again.

polar body forms a small protrusion in the bottom of this concavity. Shortly afterwards the indentation disappears. This indentation has never been observed in any other species of *Lumbricillus*. The chromo-

somes of the first polar body remain condensed, while the chromosomes of the secondary oocyte uncoil slightly. A short second meiotic metaphase is followed by the extrusion of the second polar body (Fig. 5a). Shortly afterwards the male and female pronuclei fuse to restore the diploid chromosome number.

Spermatogenesis

Spermatogenesis follow the normal pattern of the family, cf. CHRISTENSEN and NIELSEN (1955).

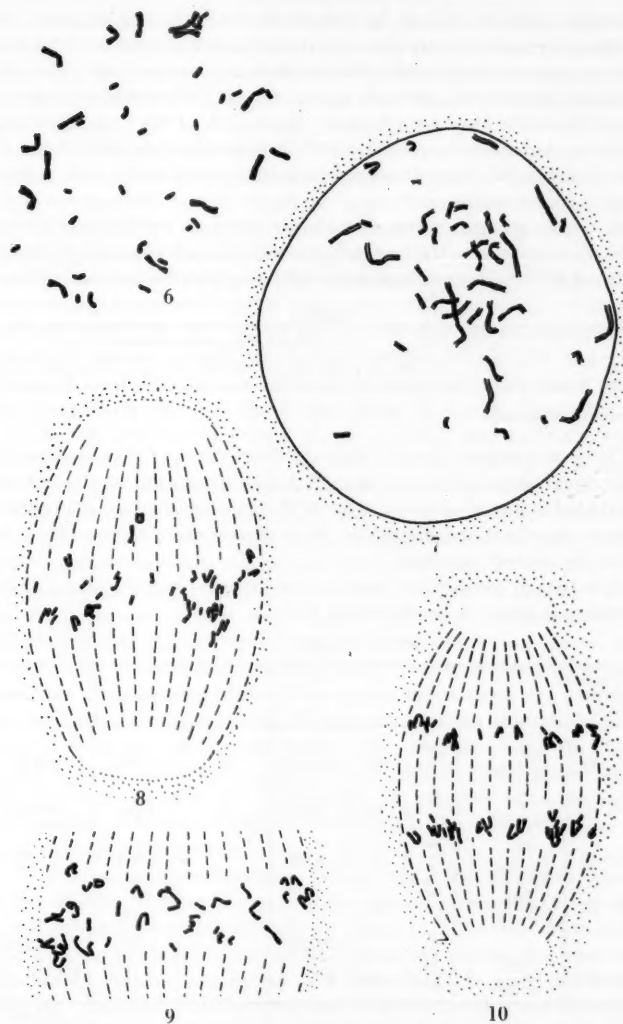
Lumbricillus lineatus 3x

The somatic chromosome number is 39 (Fig. 6). Although the differences in chromosome size are less pronounced in the triploid than in the diploid, it is still possible to distinguish 15 large meta- or submetacentric chromosomes and 24 small apparently acrocentric ones.

Oogenesis

The nucleolus is visible only at a very early prophase stage before the chromosomes are clearly distinguishable. At this stage there seems to be a concentration of chromatin around the nucleolus. When the growth phase of the egg is almost completed the chromosomes become Feulgen-positive and 39 univalent chromosomes can be counted (Fig. 7). It can be seen that these chromosomes are divided into two chromatids. These lie close together throughout their length. The nucleolus has disappeared at this stage. As prophase proceeds the chromosomes become more condensed and are evenly spaced throughout the nucleus. There is, however, a slight tendency towards concentration at a certain region which is believed to be where the nucleolus was located (Fig. 7).

During the meiotic prophase the oocyte leaves the ovary and floats freely in the cavity of segments 13 and 14, the regions in which the final growth takes place. When the growth of the oocyte is complete the nuclear membrane disappears and spindle formation begins. The chromosomes move towards the equatorial plate, this movement being most conspicuous with respect to the large metacentric chromosomes (Fig. 8). Most of the smaller chromosomes are oriented parallel to the longitudinal axis of the spindle. A typical metaphase plate with all the chromosomes arranged in the equatorial plate has never been observed. The nearest approach to the formation of a metaphase plate is shown in Fig. 9, in which the chromosomes are arranged close to the equatorial plane. In this cell some of the chromosomes are oriented in the metaphase plane whereas others have already begun to move towards the poles. This metaphase-anaphase stage, characterized by a not fully synchronous



Figs. 6—10. *Lumbricillus lineatus* 3x. Fig. 7—10 show the nucleus in the egg before deposition. 6: blastomere mitosis, $\times 900$; 7: oocyte prophase with 39 univalent chromosomes, $\times 700$; 8: the chromosomes move towards the equator after the disappearance of the nuclear membrane, $\times 700$; 9: the univalents arranged in the equatorial region, $\times 700$; 10: the chromosomes are distributed to two anaphase nuclei without equational division, $\times 700$

movement of the univalents, is of short duration. During anaphase the univalent chromosomes are now distributed to two daughter nuclei each receiving approximately half of the chromosome complement. The only difference between this division and a normal first meiotic division is that no bivalents have been formed. Since each of the daughter nuclei contain a chromosome number, which is approximately half of the somatic number, this first division is a reductional division with respect to chromosome number.

Since the somatic number of chromosomes is 39, the distribution of the chromosomes to the two daughter nuclei must be unequal. Among a total of 43 anaphases analysed the following distributions were found:

Table 1

	Distribution of chromosomes					
	19—20	18—21	17—22	16—23	15—24	14—25
Number of anaphases . .	19	10	7	3	2	1

One would expect, *a priori*, that the distribution of the chromosomes to the daughter nuclei is at random if: 1. The chromosomes are randomly distributed in the prophase nucleus. 2. The chromosomes show no affinity between prophase and anaphase. 3. A chromosome always moves towards the nearest centriole.

A statistical comparison between the expected and the observed distributions is given in the following table:

Table 2

Anaphase distribution	Exp.	Obs.	Diff.	Diff. ² /Exp.	
(19—20)	$\frac{39!}{19! 20!} \cdot \left(\frac{1}{2}\right)^{39} \cdot 2 \cdot 43 = 10.812$	19	8.188	6.204	
(18—21)	$\frac{39!}{18! 21!} \cdot \left(\frac{1}{2}\right)^{39} \cdot 2 \cdot 43 = 9.782$	10	0.218	0.0049	
(17—22)	$\frac{39!}{17! 22!} \cdot \left(\frac{1}{2}\right)^{39} \cdot 2 \cdot 43 = 8.001$	7	1.001	0.1275	
(16—23)	$\frac{39!}{16! 23!} \cdot \left(\frac{1}{2}\right)^{39} \cdot 2 \cdot 43$	7	7.405	3.8553	
⋮	} = 14.405				
(0—39)	$\frac{39!}{0! 39!} \cdot \left(\frac{1}{2}\right)^{39} \cdot 2 \cdot 43$				
				10.1917	

$$\chi^2_{-3} = 10.1917 \quad 0.025 > P > 0.01$$

The *P*-value shows that the observed distribution differs significantly from the one expected if the distribution was at random. This

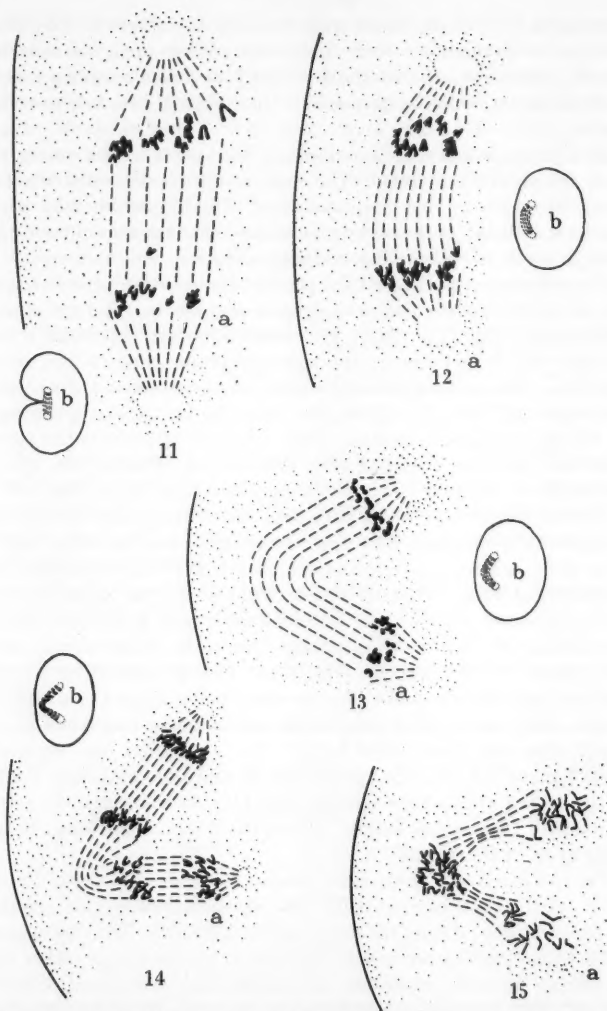
deviation is due mainly to an excess of the 19—20 class. Obviously, although no bivalents are formed the cells possess some unknown mechanism, which secures that the two daughter nuclei receive a number of chromosomes which is as close to the "haploid" as is numerically possible.

The processes hitherto described all take place in the young eggs within the mother individual. The eggs are always deposited when the chromosomes are in this anaphase stage (Fig. 10), which may persist for several months. It should be remembered that the eggs of the diploid cytotype are in MI when they are desposited.

The subsequent processes take place in the cocoons. As soon as the eggs are laid the spindle begins to elongate and the daughter nuclei move further apart (Fig. 11). About 45 minutes after egg deposition a characteristic furrow appears on the egg membrane opposite the spindle (Fig. 11b). The entire process is clearly observed under the dissecting microscope and lasts 10—15 minutes; then the furrow disappears again and the egg assumes its normal shape. Shortly afterwards the spindle bends and becomes V-shaped (Fig. 12a and b). Finally, the apex of the spindle is oriented towards the egg membrane (Fig. 13a and b).

The two chromatids, which have been paired along their whole length throughout the prophase now begin to separate and are only held together in the centromere-region as in normal first meiotic anaphase chromosomes (Fig. 12a). When the spindle has reached the typical V-shape, the chromosomes contract, the anaphase movement is arrested, and the chromosomes of the two nuclei arrange themselves in two second metaphase plates of short duration (Fig. 13a). This is followed by a second anaphase stage in which the chromosomes move along the continuous spindle. This means that two of the chromosome complements, one derived from the "first polar body", the other from the "secondary oocyte", move towards the apex of the V, and the two others towards the tips of the arms of the spindle (Fig. 14). At this stage the spindle has reached its maximal length. No centriole can at this stage be seen at the apex of the spindle.

The two daughter chromosome groups, which move towards the apex of the spindle, fuse at this point; the chromosomes remain spiralised and deeply stained during the entire process (Fig. 15). The chromosomes in this apical nucleus proceed to interphase, the nucleus is rather small and deeply stained, consisting of a dense ball of chromatin threads (Fig. 16). The chromosomes of the two nuclei at the tip of the two arms of the spindle are now almost uncoiled; they move towards each other and fuse. However, as it appears from Fig. 16, the morphology of these chromosome complements is completely different from those at the peripheral nucleus at the same stage, cf. Fig. 15.



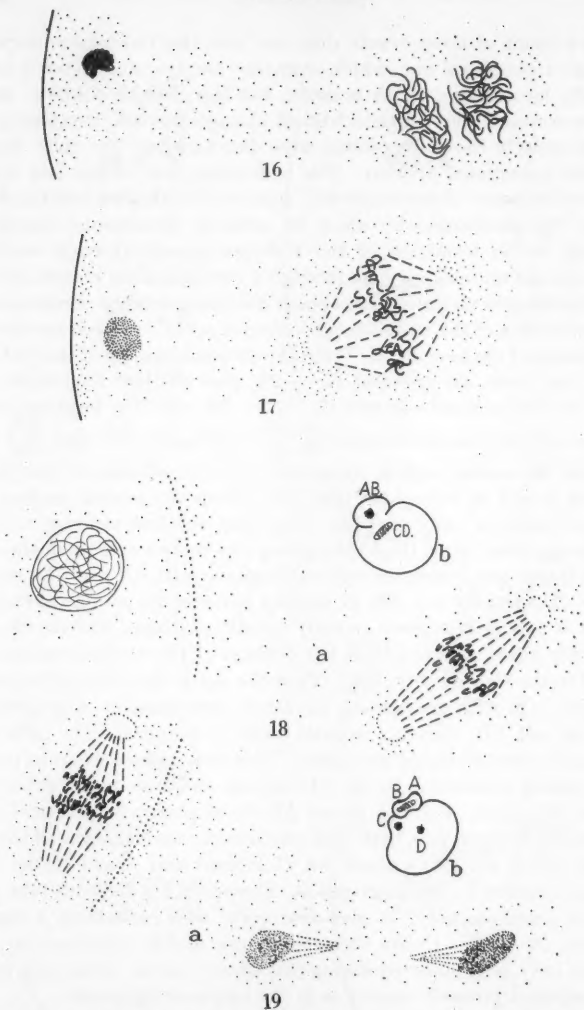
Figs. 11—15. *Lumbricillus lineatus* 3x, the egg after deposition; a: the nucleus; b: the entire egg as seen under the dissecting microscope, schematically. 11a: elongation of the anaphase spindle, $\times 700$; b: indentation of the egg membrane; 12a: the spindle bends, the chromatids only held together at the centromere, $\times 700$; b: the egg has assumed its normal shape again; 13a: the second meiotic metaphases, $\times 700$; b: the spindle is now V-shaped; 14a: the second meiotic anaphases, $\times 700$; b: the V-shaped spindle has reached its maximal length; 15: the peripheral nuclei fuse at the apex of the spindle, the chromosomes of the central nuclei uncoil, $\times 700$

As a result of these events there are now two interphase nuclei in the egg; a peripheral one, which is smaller deeply stained, and a more centrally located one, which is larger, but less Feulgen-positive. Each nucleus contains the complete triploid chromosome set, irrespective of how irregularly the chromosomes were distributed to the poles during the first reductional division. This is because each of the two nuclei have received one "chromosome set" from each of the two first anaphase nuclei. The mechanism by which the somatic chromosome number is restored, is the formation of the V-shaped spindle through bending. Although the nucleus has gone through a very abnormal reduction division, resulting in an irregular anaphase distribution of the chromosomes, the orientation of the nuclei on the V-shaped spindle controls the two by two fusions of the four nuclei. If the chromosome number of the first two nuclei has been, for instance, 17—22, then the four final nuclei will have the chromosome numbers 17—17—22—22. The bending of the spindle will give the orientation $\begin{smallmatrix} 17-17 \\ 22-22 \end{smallmatrix}$ and fusion will give $\begin{pmatrix} 17 \\ 22 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} 17 \\ 22 \end{pmatrix}$.

Now the central nucleus prepares for division, whereas the peripheral nucleus is still in interphase (Fig. 17). When the central nucleus has reached meta- or early anaphase (Fig. 18a), the first cleavage division of the egg takes place (Fig. 18b) giving rise to two cells, a smaller one and a larger one, which are conventionally named AB and CD, respectively. The smaller cell, AB, eventually contains the peripheral nucleus, which is now in interphase or early mitotic prophase, whereas the two daughter nuclei, derived from the division of the central nucleus, are found in the CD-cell (Fig. 18a). Thus the early two-cell stage contains one cell, AB, with one somatic nucleus in interphase or early prophase and one cell, CD, with two somatic nuclei in anaphase. The nucleus in AB soon enters a mitotic metaphase. This nucleus now seems to possess two normal centrioles. In the CD-cell the anaphase nuclei enter telophase (Fig. 19a). Fig. 19b shows AB developing into two small cells (A and B) of equal size, both with one somatic nucleus. One of the CD-nuclei moves out into a small cell, C, located near A and B, the other nucleus remains in the larger cell D. These two cell divisions take place almost simultaneously, to give four cells, each containing a somatic nucleus ($3x=39$). Unlike the amphimictic diploid cytotype, no polar bodies have been observed during this whole process. From now on the development proceeds exactly as in the amphimictic species.

Spermatogenesis

The seminal vesicles are absent or only slightly developed in *L. lineatus* 3x. A cytological investigation of individuals with reduced seminal vesicles showed that they never contained mature sperm, but only spermatids of variable size.



Figs. 16—19. *Lumbricillus lineatus* 3x, a and b as in Fig. 11—14. 16: the triploid peripheral nucleus at interphase (left), the central nuclei fuse (right), $\times 700$; 17: the peripheral nucleus is still at interphase, the triploid central nucleus prepares for division, $\times 700$; 18: the first cleavage division takes place as shown in b, in a is shown the peripheral AB nucleus in prophase and the central CD nucleus in early anaphase, $\times 700$; 19: the second cleavage division is about to take place as shown in b, in a is shown the AB nucleus in early anaphase and the CD nuclei in telophase; the resulting four triploid nuclei become included in the four blastomeres A, B, C and D, respectively, $\times 700$

The spermatogonial mitoses are normal, with 39 chromosomes. During the first meiotic division no bivalents are formed, but — in contrast to what is found during oogenesis — the chromosomes are often arranged in a metaphase plate containing 39 univalents, which are more contracted than in the spermatogonial divisions. In Feulgen-stained preparations some regions of the seminal vesicles seem to consist of contracted metaphase chromosomes only. This high percentage of metaphase plates suggests that this stage persists for a long time. It has not been possible to observe any stages later than metaphase, and it is possible that spermatocytes in metaphase are transformed directly into spermatids, in which stage they persist, since mature spermatozoa are never found.

Pseudofertilization

It has been shown in a previous paper (CHRISTENSEN and O'CONNOR, 1958) that the eggs of the triploid must be activated by spermatozoa from the diploid cytotype, *Lumbricillus lineatus* 2x, whereas other species will not copulate with the triploid cytotype. It has been observed that the spermatozoa stick to the egg, but they do not penetrate into the egg since a male pronucleus has never been found. Eggs which have not been activated by spermatozoa of the diploid cytotype are still able to go through the early cleavage divisions, but the development is arrested before the typical dorso-ventral curvature of the embryo takes place. It has been observed that the mitotic divisions in such inactivated eggs are very irregular and show a great variation in chromosome numbers. The cells seem to be arrested in the metaphase stage when such non-activated eggs die.

Discussion

The triploid parthenogenetic cytotype of *Lumbricillus lineatus* differs from all other cases of diploid parthenogenesis by going through a reductional division, despite complete absence of bivalent formation. In all other parthenogenetic species in which no bivalents are formed at the first meiotic division, this division follows a mitotic pattern, each univalent divides mitotically and the two daughter nuclei receive the diploid chromosome number. This classical type has been called *ameiotic* (WHITE, 1954) or *apomictic* (SUOMALAINEN, 1950), and is found for instance in weevils (SUOMALAINEN, 1947). In other cases of diploid parthenogenesis bivalents may be formed and a reduction division takes place. This type is called *meiotic* or *automictic* parthenogenesis. In such cases the somatic chromosome number is restored by fusion of the first polar body and female pronucleus, example: *Apterona helix* (NARBEL, 1946), or by fusion of the second polar body and female pronucleus, examples: *Solenobia*

lichenella (SEILER, 1923), and some enchytraeids (CHRISTENSEN, unpubl.). Finally, the somatic number may be restored by fusion between early haploid cleavage nuclei, examples: *Solenobia triquetrella* (SEILER and SCHAEFFER, 1941) and *Trialeurodes vaporariorum* (THOMSEN, 1927). A different mechanism has been described in several earthworms by MULDAL (1952) and OMODEO (1952), and in two tubificids, viz. *Tubifex tubifex* and *Limnodrilus claparedeanus* (CHRISTENSEN, unpubl.). In these species chromosome doubling takes place at the last pre-meiotic, oögonial division; as a result, the oocyte nucleus is tetraploid. It goes through a regular meiosis with normal formation of bivalents, at the first meiotic prophase, the number of bivalents corresponding to the somatic chromosome number. These bivalents are held together by typical chiasmata, meiosis is entirely normal and two polar bodies are extruded.

The division pattern found in the present triploid cytotype resembles much more the division cycle which is found in many asynaptic strains of normally amphimictic species of plants and animals, e. g. *Zea mays* (BEADLE, 1932), *Crepis capillaris* (RICHARDSON, 1938), *Scilla sibirica* (REES, 1952), and *Drosophila pseudoobscura* hybrids, (DOBZHANSKY, 1934). However, in such cases asynapsis is associated with sterility. The unique mechanism for restoring the somatic chromosome number, the formation of the V-shaped anaphase spindle in the egg, seems to be restricted to the present case.

Among the spurious instances of asynapsis, the case of *Drosophila pseudoobscura* described by DOBZHANSKY (l. c.) is of special interest. However, observations on this species are confined to spermatogenesis of hybrid males between two strains A and B (now *pseudoobscura* and *persimilis*), and no observations on oögenesis have been published.

The main features of the present mechanism are: 1. asynapsis, 2. the reductional distribution of the univalents, 3. the elongation of the anaphase I spindle, 4. the bending of the spindle, 5. the mechanism of the unipolar second anaphase movement and 6. the activation of the egg by spermatozoa from the diploid cytotype.

When considering the first phenomenon, asynapsis, we must keep in mind that the parthenogenetic cytotype is triploid, and for a number of reasons, e. g. morphological similarity and pseudofertilization, we must assume that it has evolved from the diploid amphimictic cytotype of *Lumbricillus lineatus*. Normally, polyploidy is not necessarily associated with asynapsis, but asynapsis, is known to be caused by genetic mutations, for instance in *Zea*. Thus it seems unlikely that triploidy alone in the present case should be responsible for asynapsis, but probably, following triploidy, a genic mutation has caused the asynaptic condition.

The excess of anaphases with 19–20 chromosomes is an as yet unexplained fact, but it is interesting in this connection to note that in

asynaptic *Drosophila pseudoobscura* half of the univalent chromosomes go to one pole and half to the other in a majority of cases. However, in the *Drosophila* case, the distribution of the univalents is qualitatively approximately at random, since the X and Y chromosomes are found about equally frequently at the same pole, or at opposite poles.

In such asynaptic mutants it is well known that the anaphase spindle is very much elongated. Again the *Drosophila pseudoobscura* hybrids are especially relevant. In the testes of the $B\text{♀} \times A\text{♂}$ hybrids, the first meiotic division is usually abortive and only one spermatid is produced from each primary spermatocyte. This recalls the situation during the abnormal spermatogenesis in the triploid *Lumbricillus*. The reciprocal cross, $A\text{♀} \times B\text{♂}$, behaves differently. An elongation of the anaphase spindle is observed, and due to contact between the cell membrane and the spindle, the latter bends and becomes V-shaped. In this case the bending of the spindle is undoubtedly caused by contact with the cell membrane. In *Lumbricillus* the situation is less clear, the length of the spindle from pole to pole is shorter than the longest diameter of the egg, and the bending follows immediately after the disappearance of the indentation of the egg membrane. One could imagine that this indentation would cause the bending of the spindle. It is, however, possible that the whole spindle apparatus, including the astral rays which irradiate from the poles, is so long that there is not room for it in the eggs unless it bends, and the bending could, as in the *Drosophila* case, result from contact with the cell membrane. This would explain why the apex of the V-shaped spindle comes to lie near the egg membrane, an orientation which is of great importance for the later development, since the nucleus formed at this point becomes included in the micromere, AB, at the first cleavage division.

In order to secure a regular second meiotic division in the present species, the unipolar second anaphase movement has to be considered. No centriole can be found at the apex of the V-formed spindle and no mechanism could be imagined by which a centriole could appear at this place. Hence, the mechanism of the chromosome movement at the second anaphase represents an interesting challenge to chromosome mechanism. Obviously, the movement of the two inner-most chromosome sets cannot be due to attraction between centromere and centriole, but must be due to repulsion between sister centromeres. A similar unipolar division takes place during the anomalous spermatogenesis in *Sciara* (METZ *et al.*, 1926; METZ, 1933). The nucleus in the AB cell, when it later prepares for the second cleavage division, possesses normal centrioles, although no centrioles were found at the apex of the spindle. Many cases of *de novo* origin of centrioles have been described, cf. WILSON (1926) and HARVEY (1936, 1940), and the present case may be one more example of *de novo* origin of centrioles. We would like, however, to

point to one more possibility, namely that the function of the sperm may be to provide a centriole to the apical nucleus. There is no cytological evidence for this postulate, but it would be one explanation for the otherwise rather mysterious fact that activation by spermatozoa is necessary for normal cleavage division.

In most cases in which polyploidy is associated with parthenogenesis, the polyploids have evolved from a diploid parthenogenetic ancestor (SUOMALAINEN, 1950). Whenever a sample of the present species has been thoroughly analysed the population has turned out to contain both cytotypes. Samples have been taken from geographically widely separated localities (Denmark and N. Wales) and, although several hundreds of animals have been studied cytologically, no intermediate sterile triploids or asynaptic diploids have been found. This seems to show that triploidy and parthenogenesis have arisen more or less simultaneously. However, the present material does not justify any definite conclusions, and more larger-scaled investigations on both diploids and triploids are needed in order to understand the evolution of this unique mechanism.

Acknowledgement. Thanks are due to the *State Research Foundation* whose financial assistance made this work possible.

Summary

The cytology of a diploid amphimictic ($2x=26$) and a triploid parthenogenetic ($3x=39$) cytotype of *Lumbricillus lineatus* has been described. The triploid type never produces mature sperm, but it must be fertilized by sperm from the diploid cytotype in order to produce viable eggs. However, the sperm does not enter the egg, but eggs which have not been activated by sperm die at an early stage. Oogenesis in the triploid cytotype, which results ultimately in the restoration of the somatic chromosome number, follows a pattern which has not been described in other parthenogenetic organisms. The first meiotic division is asynaptic and no typical metaphase plate is formed; the univalents are distributed to opposite poles without undergoing an equational division. The first division is therefore numerically approximately reductional. The nuclei are at anaphase when the eggs leave the animal, whereas the nuclei of the diploid amphimictic cytotype are in MI when the eggs are laid. Following activation by spermatozoa, the first anaphase spindle is much elongated, and becomes V-shaped. The first anaphase spindle persists and no second anaphase spindle is formed. At the second division the chromosomes divide mitotically. The resulting four chromosome groups fuse two by two in such a way that two nuclei are formed each with the full somatic (triploid) chromosome set (cf. Figs. 14–16).

The different steps involved in the evolution of this mechanism are discussed in relation to the evolution of the triploid cytotype.

References

- BEADLE, G. W.: A gene in *Zea mays* for failure of cytokinesis during meiosis. *Cytologia* (Tokyo) **3**, 142—155 (1932).
- CHRISTENSEN, B.: Studies on *Enchytraeidae* 6, Technique for culturing *Enchytraeidae*, with notes on cocoon types. *Oikos* (Copenhagen) **7**, 302—307 (1956).
- , and C. O. NIELSEN: Studies on *Enchytraeidae* 4, Preliminary report on chromosome numbers of 7 Danish genera. *Chromosoma* (Berl.) **7**, 460—468 (1955).
- , and F. B. O'CONNOR: Pseudofertilization in the genus *Lumbricillus*. *Nature* (Lond.) **181**, 1085—1086 (1958).
- DOBZHANSKY, TH.: Studies on hybrid sterility. I. Spermatogenesis in pure and hybrid *Drosophila pseudoobscura*. *Z. Zellforsch.* **21**, 169—223 (1934).
- HARVEY, E. B.: Parthenogenetic mesogony, or cleavage without nuclei in *Arbacia punctulata*. *Biol. Bull.* **71**, 101—121 (1936). — A comparison of nucleate and non-nucleate eggs of *Arbacia punctulata*. *Biol. Bull.* **79**, 166—187 (1940).
- METZ, C. W.: Monocentric mitosis with segregation of chromosomes in *Sciara* and its bearing on the mechanism of mitosis. *Biol. Bull. Mar. biol. Labor. Wood's Hole* **54**, 333—347 (1933).
- METZ, C. W., M. S. MOSES and E. N. HOPPE: Chromosome behavior and genetic behavior in *Sciara* (Diptera). I. Chromosome behavior in the spermatocyte divisions. *Z. indukt. Abstamm. u. Vererb.-Lehre* **42**, 237—270 (1926).
- MULDAL, S.: The chromosomes of the earthworms. I. The evolution of polyploidy. *Heredity* **6**, 55—76 (1952).
- NARBEL, M.: La cytologie de la parthénogénèse chez *Apterona helix* SIEB. (*Lepidoptera*: Psychides). *Rev. suisse Zool.* **53**, 625—681 (1946).
- NIELSEN, C. O., and B. CHRISTENSEN: The Enchytraeidae, critical revision and taxonomy of European species. *Natura Jutlandica* **8/9**, 1—160 (1959).
- OMODEO, P.: Problemi genetici connessi con la poliploidia di alcuni lombrici. *Boll. Zool.* **18**, 123—129 (1951a). — Il fenomeno della restituzione premeiotica in lombrici parthenogenetici. *Boll. Soc. ital. Biol. sper.* **27**, 1292—1293 (1951b). — Cariologia dei Lumbricidae. *Caryologia* (Firenze) **4**, 173—275 (1952).
- REES, H.: Asynapsis and spontaneous chromosome breakage in *Scilla*. *Heredity* **6**, 87—97 (1952).
- RICHARDSON, M. M.: Meiosis in *Crepis*. I and II. *J. Genet.* **31**, 101—117, 119—143 (1935).
- SEILER, J.: Geschlechtschromosomenuntersuchungen an Psychiden. IV. Die Parthenogenese der Psychiden. *Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre* **31**, 1—99 (1923).
- , u. K. SCHAEFFER: Der Chromosomenzyklus einer diploid-parthenogenetischen *Solenobia triquetrella*. *Rev. suisse Zool.* **48**, 537—540 (1941).
- SUOMALAINEN, E.: Parthenogenese und Polyploidie bei Rüsselkäfern. *Hereditas* (Lund) **33**, 425—456 (1947). — Parthenogenesis in animals. *Advanc. Genet.* **3**, 193—253 (1950).
- THOMSEN, M.: Studien über die Parthogenese bei einigen Cocciden und Aleurodiden. *Z. Zellforsch.* **5**, 1—116 (1927).
- WHITE, M. J. D.: *Animal cytology and evolution*, 2nd edit. Cambridge: University Press 1954.
- WILSON, E. B.: *The cell in development and heredity*, 3rd edit. New York: Mac Millan & Co. 1925.

Dr. BENT CHRISTENSEN,
Universitetets Zoologiske Laboratorium,
Nørregade 10, København K, Denmark

Aus dem Max Planck-Institut für Meeresbiologie, Abt. H. BAUER, Wilhelmshaven

DIE OOGENESE EINIGER PARTHENOGENETISCHER ORTHOCLADIINEN (DIPTERA)

Von

HANS SCHOLL

Mit 22 Textabbildungen

(Eingegangen am 23. April 1960)

Einleitung

Die Eigentümlichkeiten im Chromosomenzyklus der Orthocladiinen sind von BAUER und BEERMANN (1952a, b) entdeckt worden. Bei den bisher untersuchten Arten dieser Unterfamilie der *Chironomidae* treten in der Keimbahn höhere Chromosomenzahlen auf als im Soma. Diese Erscheinung, die in ähnlicher Weise von den Dipteren-Familien *Sciariidae* und *Cecidomyiidae* bekannt ist (vgl. WHITE 1959), beruht darauf, daß bestimmte Chromosomen zu Beginn der Embryonalentwicklung aus dem Soma vollständig eliminiert werden (Soma-Elimination). Bei den Orthocladiinen verhalten sich die im Soma allein verbleibenden Chromosomen (s-Chromosomen) auch während der Keimzellenentwicklung normal; dagegen treten zahlenändernde Prozesse an den auf die Keimbahn beschränkten Chromosomen (k-Chromosomen) auf. Bereits in der Urkeimzelle erfolgt eine Elimination, die die Zahl der k-Chromosomen auf etwa die Hälfte reduziert (Keimbahn-Elimination). Bei der letzten Gonienteilung (Differentialmitose) gelangen die nicht eliminierten k-Chromosomen ungeteilt in eine Tochterzelle, die zur Spermatocyte bzw. Oocyte wird; die andere Tochterzelle, die nur die s-Chromosomen erhält, degeneriert in der Spermatogenese nach atypischen Reifeteilungen; in der Oogenese wird sie zur Nährzelle. Schon in der Telophase der Differentialmitose zeigt jedes k-Chromosom deutlich einen Längsspalt; es bildet sich nach weiterer Spaltung seiner Chromatiden während der meiotischen Prophase in ein k-Bivalent um, das sich im Verhalten von den aus s-Chromosomen nach Paarung gebildeten s-Bivalenten nicht unterscheidet. Diese Befunde sind an bisexuellen Arten erhoben worden.

In der Unterfamilie der *Orthocladiinae* ist in den letzten 20 Jahren das nicht seltene Vorkommen parthogenetischer Fortpflanzung bekannt geworden (vgl. THIENEMANN 1954). Erste cytologische Befunde an obligatorisch parthogenetischen Arten (SCHOLL 1956) gaben allgemein Auskunft über Charakter und Verlauf der Reifeteilungen. Über die nunmehr

etwas umfangreichen Beobachtungen an verschiedenen Arten wird hier berichtet. Vollständigkeit konnte aus äußeren Gründen nicht erreicht werden.

Herrn Prof. Dr. H. BAUER danke ich für die Anregungen zu dieser Arbeit und ihre stete Förderung, Herrn Dr. K. STRENZKE für seinen Rat in taxonomischen Fragen.

Material und Methode

Die untersuchten Arten und ihre Fundorte gibt die folgende Liste an. Mit Ausnahme je eines Fundortes der beiden letztgenannten Arten liegen die Herkünfte in Nordwestdeutschland.

- Limnophyes biverticillatus* REMMERT (1955) Neuenburger Urwald, Mariensiel, Varel, Hafen, Hohenberge, Oberdeich, Seefeld, Schwei, Wittmund, Barkeler Busch.
- Limnophyes virgo* REMMERT (1955) Neuenburger Urwald, Mariensiel, Schwei, Barkeler Busch.
- Pseudosmittia arenaria arenaria* STRENZKE (1960) Neuenburger Urwald, Wilhelmshaven (Institutsgelände), Dangast, Hohenberge, Mariensiel.
- Pseudosmittia arenaria flava* STRENZKE (1960) Wilhelmshaven (Institutsgelände)
- Pseudosmittia baueri* STRENZKE (1960) Wilhelmshaven (Institutsgelände), Gießen.
- Smittia spec.*¹ Frankfurt a. M., Barnstorf, Wilhelmshaven (Wiesen beim Institutsgelände).

Die untersuchten Species lassen sich ohne Schwierigkeiten nach den für Tipuliden entwickelten Methoden in flachen Schalen züchten. Der Boden der Kulturschalen wird mit einer Schicht aufgeschlämmten Zellstoffbrei ausgelegt, der immer feucht bleiben muß. Als Nahrung dient kommerzielles Brennesselpulver, das nach Bedarf nachgefüllt wird. In einer Glasschale von etwa $\frac{1}{2}$ Liter Inhalt (Milchsätte) können sich mehrere Generationen entwickeln.

Um gut ausgebildete Speicheldrüsenchromosomen zu erhalten, wurden die Larven bei reichlicher Fütterung aufgezogen und vom 12. Tag an bei $+5^{\circ}\text{C}$ gehalten. Die Präparation erfolgte nach der üblichen Methode (vgl. BEERMANN 1952).

Für die Untersuchung des Keimbahnchromosomenzyklus wurden die Larven entsprechenden Alters in Alkohol-Eisessig fixiert und mit Karmin-Essigsäure total angefärbt. Nach etwa 15 min lassen sich die Ovarien leicht herauspräparieren. Die endgültige Färbung und Verarbeitung erfolgt wie bei den Speicheldrüsen. Um zeitlich exakt bestimmtes Material der Reifungsstadien zu erhalten, werden Kopf und Thorax 1–2 Tage alter Imagines mit der Pinzette zerquetscht. Dadurch wird gewöhnlich innerhalb von 5–10 min die Ablage aller Eier ausgelöst. Die Eier wurden in Portionen zu 10 Stück in Abständen von 5 min fixiert und in Orcein-Essigsäure-Milchsäure als Quetschpräparate untersucht.

Das Eintreten der wichtigsten cytologischen Ereignisse innerhalb der Ei- und Larvenentwicklung konnte zeitlich relativ sicher festgelegt werden, wie die anschließende Tabelle zeigt.

¹ Die parthenogenetische *Smittia spec.* gehört nach Angaben von Herrn Dr. STRENZKE zur *aquatilis*-Gruppe.

Tabelle

Metaphase I	0—15 min
Anaphase I	15—20 min
Telophase I	20—30 min
Metaphase II	35 min
Anaphase II	40—45 min
Beginn der Furchungsteilungen	70—80 min
Schlüpfen der Larven	2. Tag
Oogonienmitosen (2. Larvenstadium)	ab 10. Tag
Differentialmitosen (Ende des 3. Larvenstadiums)	13.—15. Tag
Frühe Prophase der Oocyten (4. Larvenstadium)	16.—18. Tag
Schlüpfen der Imagines	20.—21. Tag

Die angegebenen Zeiten gelten vom Augenblick der Eiablage ab bei Zimmertemperatur (19—22° C) und sind bei allen untersuchten Arten ungefähr gleich.

Befunde

Limnophyes biverticillatus

Diese Art hat diploid 6 s-Chromosomen und keine Keimbahnchromosomen (SCHOLL 1956). Von den 3 Chromosomen der Speicheldrüsen enthalten 2 heterozygote Strukturmutationen (Inversionen und komplexe intrachromosomale Verlagerungen).

Mit ihrem einfachen Chromosomenbestand bietet sie die übersichtlichsten Verhältnisse für die Aufklärung des Ablaufs der Eireifung. In der frühen Prophase der ersten Reifeteilung enthält der Oocytenkern fadenförmige Chromosomen; Abb. 1a läßt 4 Fäden von unterschiedlicher Länge erkennen. Die gleiche Dicke aller Chromosomen und eine schwach angedeutete Einschnürung in der Mittelregion jedes der beiden langen Fäden berechtigt zu der Annahme, daß sie aus jeweils 2 terminal assoziierten Chromosomen gebildet werden. Für einen Parallelkonjugation fehlen Hinweise; da in dem beschriebenen Kern 2 ungepaarte Elemente auftreten, tritt vermutlich auch in früheren Stadien der Oocyten keine reguläre Längspaarung ein (vgl. *Pseudosmittia a. arenaria*, Abb. 11).

Unmittelbar nach der Ablage der Eier befinden sich die stark kontrahierten Chromosomen überwiegend als Univalente in der Region des Spindeläquators (Abb. 1b, c). Die Orientierung der zipfelförmig ausgezogenen Kinetochorenregionen auf die Spindelpole ist offenbar weitgehend zufallsgemäß; denn die Anzahl der in der Anaphase auf beide Pole verteilten Univalenten ist variabel. Die Verteilungen 3:3 (Abb. 1c, d, f) und 2:4 (Abb. 1b, e, g) wurden unter 67 Fällen 40- bzw. 23mal beobachtet, die Verteilung 1:5 nur 4mal. Bivalentartige Chromosomenaggregate sind wohl auf die terminale Assoziation in der Prometaphase, nicht auf Homologenpaarung zurückzuführen (Abb. 1b—d). In der Abb. 1b scheinen, nach der Größe zu urteilen, 2 nichthomologe Elemente miteinander verbunden zu sein; ihre Orientierung zu einem Pol zeigt an, daß es sich nicht um ein normales Bivalent handelt.



Abb. 1a—i. *Limnophyes biverticillatus*. a Prophase zur 1. Reifeteilung. b Metaphase I, Stadium unmittelbar nach der Eiablage; Verteilungsverhältnis 2:4. c Metaphase I, älteres Stadium als b; Verteilungsverhältnis 3:3. d Metaphase I, älteres Stadium als c; die Verklebung der Chromosomenarme beginnt sich zu lösen; Verteilungsverhältnis 3:3. e Frühe Anaphase I, 15 min nach der Eiablage; Verteilungsverhältnis 2:4, die beiden submediokinetischen Elemente sind nach unten ausgerichtet. f Anaphase I; Verteilungsverhältnis 3:3, die beiden submediokinetischen und ein mediokinetisches Element sind nach unten ausgerichtet. g Telophase I, 25 min nach der Eiablage; Verteilungsverhältnis 2:4. h Beginn der Spindelrestitution zur Anaphase II, 35 min nach der Eiablage. i Anaphase II, 40 min nach der Eiablage

Mit dem Beginn der Anaphase verlängern sich die Chromosomen; dabei lösen sich die Verklebungen der Arme (Abb. 1d). Ist dieses Stadium weiter fortgeschritten, so wird der Chromatidenspalt sichtbar (Abb. 1e, f); ein submediokinetisches Chromosomenpaar kann dann von

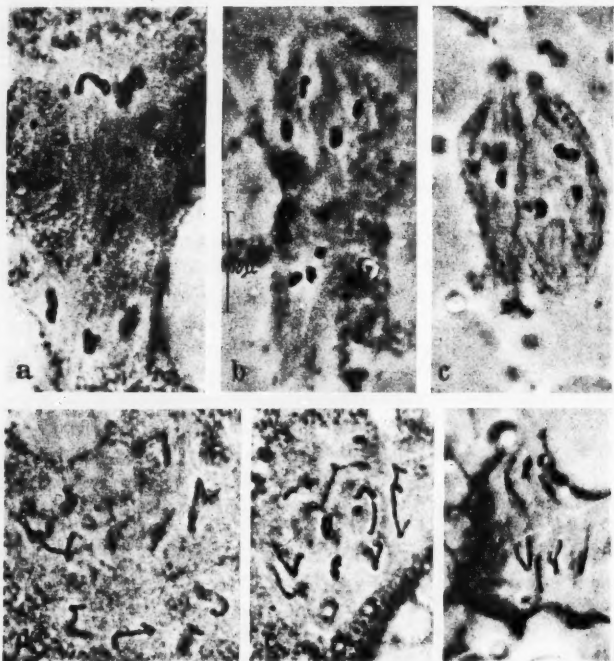


Abb. 2a—f. *Limnophyes biverticillatus*. Verlauf der Spindelbildung zur Anaphase II. a Telophase I. b Übergangsphase, jedes Chromosom mit eigener Spindel. c Zusammenschluß der Einzelspindeln vor der Anaphase II. d, e Beginnende Anaphase II vor dem Zusammenschluß der Einzelspindeln. f Späte Anaphase II

2 mediokinetischen Paaren unterschieden werden. In etwa der Hälfte der Fälle waren beide submediokinetischen Elemente zum gleichen Pol ausgerichtet, was die Zufallseinordnung der Chromosomen in der Spindel deutlich demonstriert.

In der Telophase liegen die Chromosomen lose gruppiert an den Spindelpolen (Abb. 1g, 2a). Die Anaphase der 2. Reifeteilung setzt bereits ein, während die Chromosomen noch die Anordnung der Telophase I aufweisen (Abb. 1h). Es bildet sich um jedes Element ein heller, gestreckter Hof aus, der wohl eine kleine Einzelspindel ist (Abb. 2b). Diese

Einzelspindeln schließen sich allmählich zu einer gemeinsamen Spindel zusammen (Abb. 2c, e), in der die Chromatiden bald so liegen, als seien sie aus einer richtigen Metaphaseplatte hergeleitet. Die weitere Anaphase II bietet dann ein normales, ungestörtes Bild (Abb. 1i, 2f). Es wird keine der beiden Tochterkerne zu einem degenerierenden oder sich abnorm teilenden Richtungskern; beide nehmen vielmehr an der Weiterentwicklung teil.

Eine Interphase trennt die Reifeteilung von der 1. Furchungsteilung, die für beide Kerne synchron verläuft und daher im Effekt eine 2. Furchungsteilung ist. In den folgenden Teilungen sind die Chromosomen



Abb. 3a—c. *Limnophyes biverticillatus*. Endomitose im Nährzellkern; in c rechts oben die Oocyte

wegen ihrer geringen Größe nicht mehr gut zu verfolgen. Beobachtungen über ihr Verhalten während der Embryonalentwicklung und Larvenentwicklung fehlen deshalb.

Wie bei den bisexuellen Arten führt die letzte Oogonienteilung im 4. Larvenstadium zur Differenzierung der Oocyten und Nährzellen. In den Nährzellen treten Endomitosen auf. Ihr Kern läßt zunächst drei schollige Gebilde erkennen, die die somatisch gepaarten Chromosomen darstellen (Abb. 3a). Der 1. Schritt zur Vermehrung der Elemente ist offenbar die Trennung der Homologen (Abb. 3b). Darauf folgt eine Auflockerung und Volumenzunahme der Chromosomen, die dann wieder ein unregelmäßig geformtes, scholliges Aussehen annehmen (Abb. 3c). Weiter wurde dieser Vorgang nicht verfolgt.

Limnophyes virgo

Somatische Metaphasen (Abb. 4) enthalten 9 Chromosomen in 3 Paarungsgruppen. *L. virgo* stellt damit einen Fall von Triploidie dar; aus der Paarungsweise der Speicheldrüsenchromosomen geht dies einwandfrei hervor (SCHOLL 1956). Dazu kommen 6 k-Chromosomen, was sich in den Metaphasen I der Eireifung am eindeutigsten feststellen ließ. Abweichungen von dieser Zahl wurden nur ausnahmsweise gefunden.

Eine Keimbahn-Elimination in der Urkeimzelle konnte nicht beobachtet werden. In den Metaphasen der Oogonienmitosen wurden vorwiegend 15 Chromsomen gezählt (Abb. 5); im gleichen Ovar können aber auch Metaphasen mit nur 12 Elementen vorkommen. Demnach ist zu folgern, daß die Elimination, die selbst nie beobachtet wurde, in einer

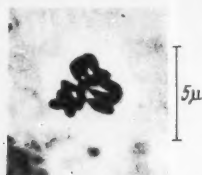


Abb. 4. *Linnophyes virgo*. Somatische Metaphase aus dem Follikel-epithel des Ovars



Abb. 5. *Linnophyes virgo*. Oogonienmetaphase mit 15 Chromosomen

späteren Oogonienteilung nachgeholt wird. Die letzte Oogonienteilung ist eine Differentialmitose, die ebenso wie bei den bisexuellen Arten verläuft. Die Keimbahnchromosomen sammeln sich an einem Pol (Abb. 6a, 6b); sie sind morphologisch nicht von den in der Äquatorebene liegenden s-Chromosomen zu unterscheiden und lassen bei geeigneter Lage wie diese einen Längsspalt erkennen (Abb. 6a). Unter den hier beschriebenen



Abb. 6a—d. *Linnophyes virgo*. Differentialmitose. a Metaphase mit 3 k-Chromosomen. b Metaphase mit 2 k-Chromosomen. c Anaphase mit 4 k-Chromosomen. d Telophase (k-Chromosomen liegen jeweils oben)

Arten ist *L. virgo* die einzige, bei der die Zahl der k-Chromosomen während der Differentialmitose sicher festgestellt werden konnte. Sie beträgt meistens 3 (Abb. 6a), aber auch die Zahlen 2 (Abb. 6b) und 4 (Abb. 6c) wurden beobachtet, niemals jedoch 6, ein weiterer Hinweis darauf, daß in jeder Gonienzelle eine k-Chromosomenelimination einmal stattgefunden haben muß. Die s-Chromosomen teilen sich mitotisch (Abb. 6c, d). Die eine Tochtergruppe vereinigt sich mit den k-Chromosomen, während die andere am Gegenpol der Spindel isoliert wird und dann den Kern der Nährzelle abgibt.

Für die 1. Reifeteilung liegen Beobachtungen nur von der Metaphase ab vor. Unmittelbar nach der Eiablage befinden sich die Chromosomen in stark kontrahiertem Zustand in einer verhältnismäßig gut geordneten Metaphaseplatte. Univalente sind häufiger als Zweierverbände; die Keimbahnchromosomen unterscheiden sich strukturell nicht von den



Abb. 7a—d. *Limnophyes virgo*. 1. Reifeteilung. a, b Metaphase I, a Stadium unmittelbar nach der Eiablage; Verteilungsverhältnis 6:9. b Frühe Anaphase I, Kinetochorenregion weit ausgezogen. c Mittlere Anaphase I, Stadium 15 min nach der Eiablage; Despiralisierung der Chromosomen. d Späte Anaphase, 20 min nach der Eiablage. Interkineseartiges Stadium

s-Chromosomen. Charakteristisch sind die lang ausgezogenen Kinetochorregionen (Abb. 7a); sie liegen beiderseits der Äquatorialebene in ungefähr gleicher Höhe und erlauben meistens eine genaue Bestimmung der Chromosomenzahl und des Anaphaseverteilungsverhältnisses. Letzteres liegt in den beobachteten Fällen bei 5:10, 6:9 und 7:8, was bei einer unabhängigen, zufallsgemäßen Orientierung erwartet würde. In den Oocyten der Abb. 7a und b sind 15 Einzelchromosomen vorhanden. Dies scheint die Norm darzustellen. Seit der Differentialmitose mit ihren 12 Chromosomen ($9s + 3k$ -Elemente) ist also eine Verdoppelung der Anzahl der k-Chromosomen eingetreten.

Im späten Metaphasestadium (Abb. 7b) erscheinen die Kinetochorenregionen noch stärker ausgestreckt. Dieser Effekt verschwindet bei dem Eintritt der Anaphase (Abb. 7c). Gleichzeitig lockert sich die Struktur der Chromosomen auf und ihre Färbbarkeit läßt nach, so daß sie während der Anaphase nicht mehr individuell erkannt werden können (Abb. 7d). Erst in der Telophase treten sie klar unterscheidbar und mit deutlichem Chromatidenspalt wieder in Erscheinung (Abb. 8).

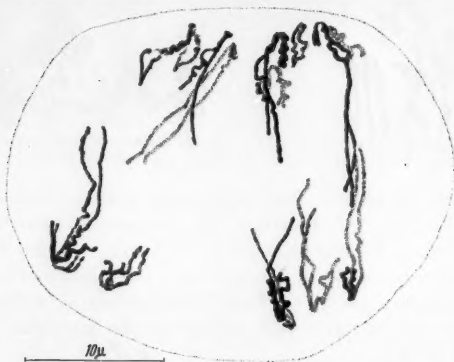


Abb. 8. *Limnophyes virgo*. Übergang zur 2. Reifeteilung. Chromosomen werden mit deutlichem Spalt wieder sichtbar; Verteilung 8:7

Genau wie bei *L. biverticillatus* wird die Oocyte nach dieser Pseudoreduktion nicht geteilt. Die weitere Entwicklung verläuft so, wie es für diese Art oben beschrieben worden ist.

Zwei Zuchtklone zeigten den übrigen gegenüber cytologische Unterschiede. Die Speicheldrüsen zeigen bei allen Stämmen nur eine kleine Inversion, die aber bei den letzteren beiden Stämmen in einem anderen Chromosom liegt. Bei diesen tritt in der Metaphase I keine geordnete Äquatorialplatte auf (Abb. 9a). Die Chromosomen sind in diesem Stadium auch weniger stark kontrahiert und ihre Kinetochorenregionen nicht so stark ausgezogen (Abb. 9b). Wegen der aufgelockerten Form der Chromosomen läßt sich ihre genaue Anzahl nicht bestimmen. Sie scheint zwischen 15 und 19 zu variieren. Die Anaphase verläuft, ohne daß die Chromosomen diffus werden (Abb. 9c, d). Im weiteren zeigen sich keine Abweichungen vom Teilungsablauf bei den übrigen Stämmen.

Pseudosmittia arenaria

Diese Art umfaßt nach STRENZKE (1960) 2 Subspecies, *Pseudosmittia arenaria* und *Pseudosmittia arenaria flava*. Beide weisen diploid 4 s-Chromosomen, ein langes und ein kurzes V-förmiges Paar auf

(Abb. 10a, b); dagegen sind die beiden Unterarten cytologisch in anderer Hinsicht recht verschieden.

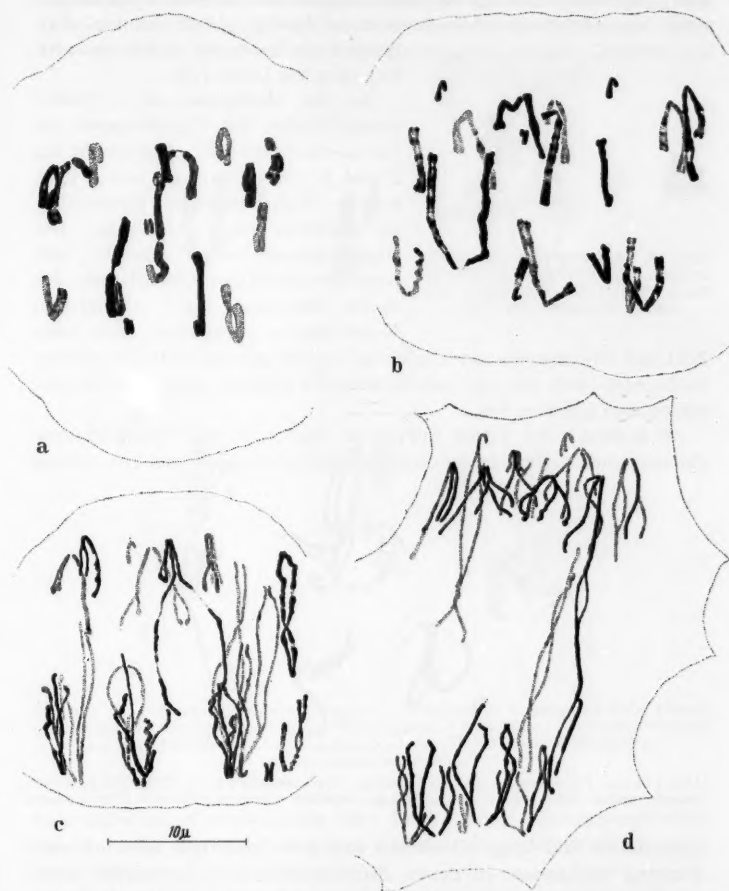


Abb. 9 a—d. *Limnophyes virgo*. 1. Reifeteilung. a Metaphase I. b Frühe Anaphase. c Mittlere Anaphase. d Späte Anaphase. (Chromosomenzahl nicht genau festzustellen)

P. a. arenaria hat keine k-Chromosomen; in den Speicheldrüsen liegt keine erkennbare Strukturheterozygotie vor. In der Prophase der 1. Reifeteilung sind die Chromosomen fadenförmig. Die Zahl der isoliert

auftretenden Elemente ist wechselnd (Abb. 11a—e). Terminale Vereinigungen der Chromosomen scheinen durch kurze, schwach gefärbte und leicht eingeschnürte Regionen angedeutet zu sein. Parallellagerung von Chromosomenabschnitten ist häufig; dabei kommen aber sicher auch Paarungen nichthomologer Regionen vor (Abb. 11e).



Abb. 10. a *Pseudosmittia arenaria arenaria*. b *Pseudosmittia arenaria flava*. Somatische Metaphasen aus dem Follikel-epithel des Ovars

In der Metaphase der 1. Reifeteilung treten die Chromosomen als Univalente sowie in Aggregaten zu 2 und 3 (Abb. 12b) auf, wobei Paarungen Nichthomologer einwandfrei zu erkennen sind (Abb. 12a). Die Anaphasenverteilung scheint sich nach der zufälligen Orientierung der in der Metaphase nicht erkennbaren Kinetochoren zu richten. Alle nach

Zahl und Chromosomenart möglichen Verteilungskombinationen wurden beobachtet (Abb. 12c—f); jedoch wandern niemals sämtliche Chromosomen zum gleichen Pol.

P. a. flava. Bei dieser Subspecies liegen in den Speicheldrüsen-chromosomen zahlreiche heterozygote Strukturmutationen vor. Neben

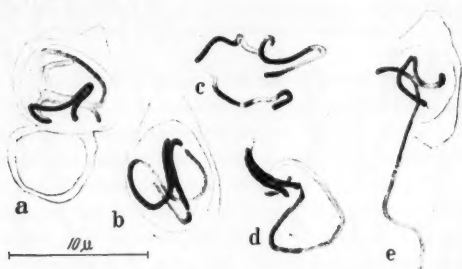


Abb. 11a—e. *Pseudosmittia arenaria arenaria*. Prophasestadien zur 1. Reifeteilung. a oben Oocyte, unten Nährzelle. b, e Parallellage zwischen langen und kurzen Chromosomen

Inversionen sind lange Abschnitte mit unvollständiger oder fehlender Paarung vorhanden, in denen Struktur-differenzen homologer Querscheiben vorzukommen scheinen. Diese cytologischen Unterschiede zwischen *P. a. arenaria* und *P. a. flava* lassen es als möglich erscheinen, daß den beiden Formen systematisch ein höherer als Subspecies-Rang zuzuschreiben ist.

P. a. flava besitzt k-Chromosomen. Diese sind in den Interphasen der Oogonienteilungen zu einer heteropyknotischen Masse verschmolzen

(Abb. 13a), die sich auch während der Differentialmitose nicht auflöst. Die Gesamtheit der k-Chromosomen wandert dann als rundliches, unregelmäßig geformtes, oft 3teiliges Gebilde zu einem Spindelpol (Abb. 13b—d). Die Teilung der s-Chromosomen vollzieht sich normal (Abb. 13e—g). Nach Abschluß der Differentialmitose können Oocyten und

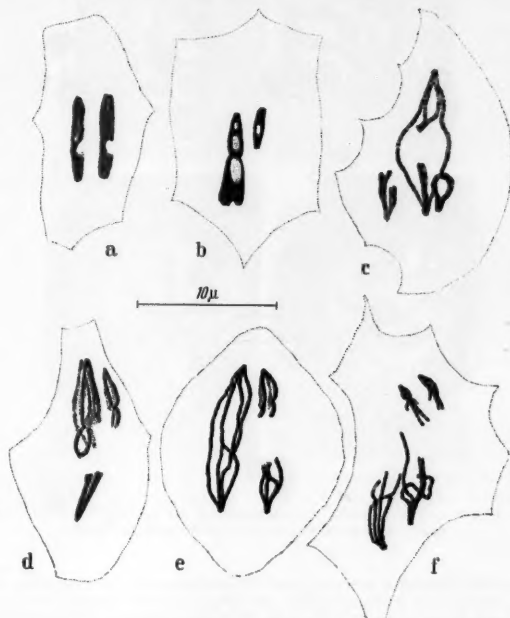


Abb. 12a—f. *Pseudosmittia arenaria arenaria*, 1. Reifeteilung. a Metaphase I mit 2 durch inhomologe Verbindung entstandenen Zweiergruppen. b Metaphase I mit einem Univalent und einer Dreiergruppe. c—f Anaphasen I mit verschiedenen Möglichkeiten der Chromosomenverteilung

Nährzellen am Vorhandensein oder Fehlen eines heteropyknotischen Klumpens aus den k-Chromosomen von einander unterschieden werden (Abb. 13h).

Die Prophase der 1. Reifeteilung beginnt mit der Ausbildung fadenförmiger s-Chromosomen; die k-Chromosomen bleiben zunächst verklumpt (Abb. 13i, 14a), lösen sich aber später ebenfalls als fadenförmige Elemente voneinander (Abb. 14b), die noch teilweise verklebt bleiben und dabei gelegentlich sternförmige Aggregate bilden können (Abb. 14c, 15a). Sie sind in diesem Stadium stärker färbbar als die s-Chro-

mosomen und zeigen im Gegensatz zu diesen einen deutlichen Längsspalt. Es ist nicht zu entscheiden, ob sich seit der Differentialmitose die Chroaetiden noch nicht getrennt haben oder ob der neue Längsspalt schon aufgetreten ist. Der k-Chromosomenverband zerfällt schließlich in einzelne Fadenabschnitte, deren Anzahl aber meist geringer ist als

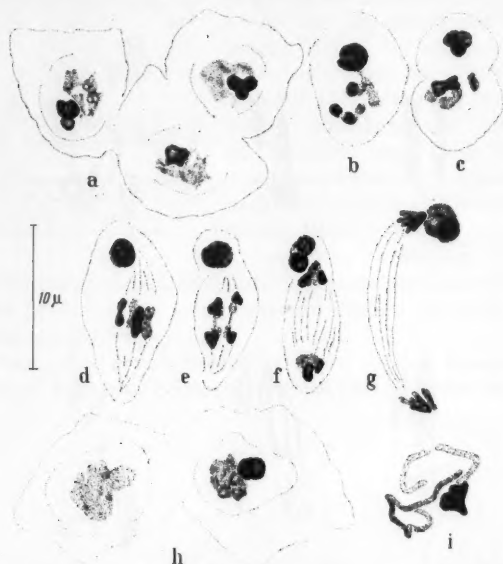


Abb. 13a—i. *Pseudosmittia arenaria flava*, Differentialmitose. a 3 Oogonien-Interphasen mit heteropyknotischen k-Chromosomen. b, c Prophase zur Differentialmitose. d Metaphase. e, f Anaphasestadium. g Telophase. h Abkömmlinge der Differentialmitose; links Nährzelle, rechts Oocyte. i Oocyte in früher Prophase zur 1. Reifeteilung. 4 s-Chromosomen und heteropyknotische k-Chromosomen. In dem heterochromatischen k-Chromosomenaggregat lassen sich bei a, c, f und g je 3 Elemente unterscheiden

die der k-Chromosomen (Abb. 15b, c); einige von ihnen bleiben also noch verklebt.

Die Metaphase der 1. Reifeteilung erlaubt keine eindeutige Bestimmung der Chromosomenzahl. Die Abb. 16a—c zeigt 10 bzw. 7 Einheiten verschiedener Größe. Es ist jedoch anzunehmen, daß die häufig vorkommenden langgestreckten Elemente aus zwei terminal verklebten Chromosomen bestehen; k- und s-Chromosomen lassen sich nicht unterscheiden. Die Anaphase, in der mediokinetische Chromosomen erkennbar werden, gibt klar Aufschluß darüber, daß neben den 4 s-Chromosomen meist 6 k-Chromosomen vorhanden sind. Als Ausnahmen wurden

Stadien mit insgesamt 8 und solchen mit 12 Chromosomen beobachtet. Die weitere Entwicklung zeigte keine Abweichungen vom Verlauf bei den oben beschriebenen Arten.

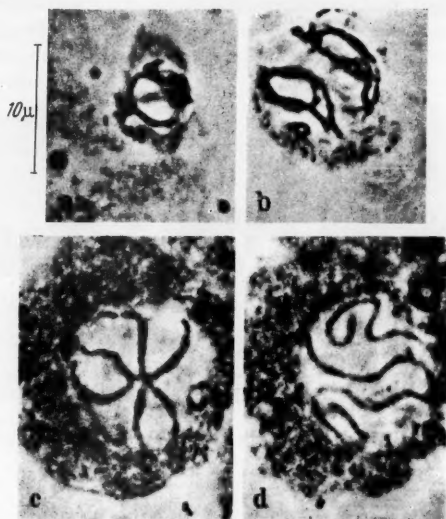


Abb. 14a—d. *Pseudosmittia arenaria flava*. a Differenzierung der Fadenform der s-Chromosomen, k-Chromosomen noch verklumpt. b Gleiche Differenzierung der k-Chromosomen. c Sternförmige Aggregationsfigur der längsgespaltenen k-Chromosomen. d s-Chromosomen aus dem gleichen Kern wie c bei anderer Einstellung

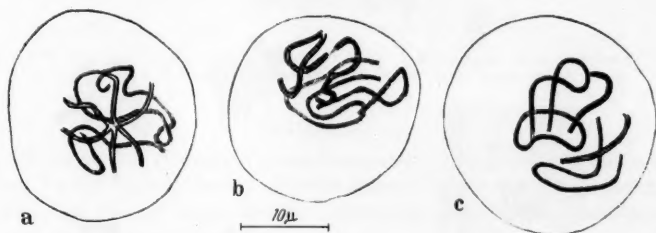


Abb. 15a—c. *Pseudosmittia arenaria flava*, Prophase zur 1. Reifeteilung. a Sternförmige Aggregationsfigur der k-Chromosomen, die s-Chromosomen sind schwächer gefärbt. Gleicher Kern wie Abb. 14c u. d. b, c Fortschreitende Isolierung der k-Chromosomen

Pseudosmittia baueri

Diese Art hat ähnlich wie *P. arenaria* im Soma $2n=4$ Chromosomen; das kleinere Paar ist jedoch telokinetisch (Abb. 17). Die Zahl der

k-Chromosomen in der Differentialmitose ist nicht einwandfrei bestimmbar, sie scheint etwas mehr als 15 zu betragen (Abb. 18a, b). Im Zeit-

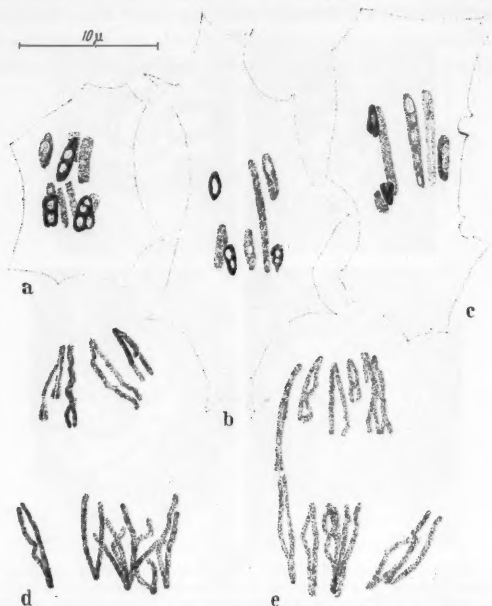


Abb. 16a—c. *Pseudosmittia arenaria flava*, 1. Reifeteilung. a—c Metaphase I, Stadium unmittelbar nach der Eiablage. d, e Anaphase. Chromosomenverteilung bei a, c, d 4:6, bei b 3:5, bei e 6:6 (?)



Abb. 17. *Pseudosmittia baueri*. Somatische Metaphase aus dem Follikel-epithel des Ovars; das kleinere Chromosomenpaar ist telokinetisch

Abb. 18a u. b. *Pseudosmittia baueri*, Differentialmitose. a Metaphase, b Telophase. Die k-Chromosomen liegen oben

punkt der Metaphase I ist keine Identifizierung einzelner Chromosomen in den Oocyten möglich (Fixierungsartefakt?). Die Form des Klum-

pens, den die miteinander verklebten Chromosomen bilden, läßt auf eine metaphasische Anordnung schließen (Abb. 19a). Mit beginnender Anaphase werden Einzelchromosomen sichtbar (Abb. 19b). Die isoliert hervortretenden Elemente sind längsgespalten (Abb. 19c); ihre nicht genau bestimmbare Zahl läßt die Annahme von etwas über 30 k-Chromosomen zu, wie sie nach den Verhältnissen in der Differentialmitose zu erwarten ist.



Abb. 19a—c. *Pseudosmittia baueri*, 1. Reifeteilung. a Metaphase mit verklumpten Chromosomen. b, c Anaphase mit längsgespaltenen Chromosomen



Abb. 20a—d. *Smittia spec.*, Differentialmitose. a Metaphase. b, c Anaphase. d Telophase. k-Chromosomen sind zu einer ringförmigen Masse verschmolzen

Smittia spec.

Diese Art hat von allen untersuchten parthenogenetischen Orthoclaadiinen die cytologisch klarsten Speicheldrüsen-Chromosomen (vgl. BAUER 1957), die bis auf einige kleinste Differenzen einzelner Querscheibepaare strukturmorphozygot sind.

Während der Differentialmitose sind 6 s-Chromosomen vorhanden (Abb. 20a—d); die k-Chromosomen sind dagegen zu einem ringförmigen Körper verschmolzen. In der Metaphase der 1. Reifeteilung treten die Chromosomen ganz überwiegend als Univalente auf (Abb. 21a, 22a). Das Anaphasestadium (Abb. 21b) zeigt deutlich ausgezogene Kinetochorenregionen; in der Abb. 21b sind 38 Chromosomen zählbar, im

Kern der Abb. 21 a sind es wahrscheinlich einige weniger. Daraus würde eine k-Chromosomenzahl resultieren, die bei 30 liegt. Eine Besonderheit

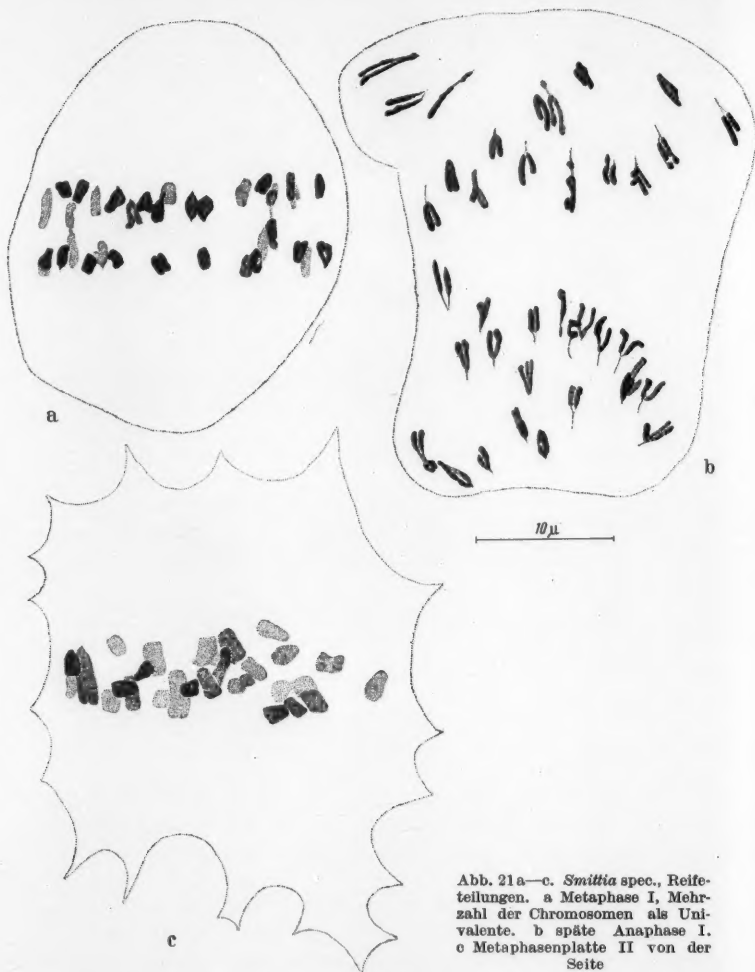


Abb. 21 a—c. *Smittia spec.*, Reifeteilungen. a Metaphase I. Mehrzahl der Chromosomen als Univalente. b späte Anaphase I. c Metaphasenplatte II von der Seite

im Vergleich zu den vorstehend beschriebenen Arten bietet die Metaphase der 2. Reifeteilung. Es wird hier eine reguläre Äquatorialplatte

ausgebildet (Abb. 21 c, 22 d), deren Chromosomen gegenüber dem vorangegangenen Stadium stärker kontrahiert sind.

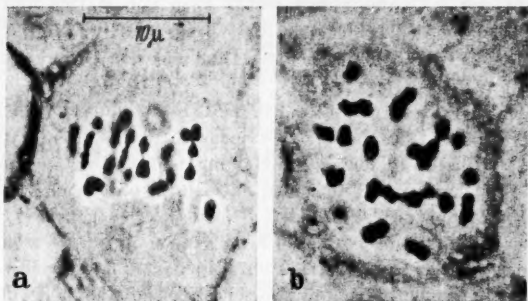


Abb. 22 a u. b. *Smittia* spec., Reifeteilungen. a Metaphase I; b Metaphase II

Diskussion

Die vorliegenden Befunde zeigen, daß bei den obligatorisch parthenogenetischen Orthocladiinen eine in ihrem Effekt apomiktische Oogenese (SUOMALAINEN 1950) vorkommt, die in ihrem Verlauf, in der Anlage der Spindel und der Durchführung der Pseudoreduktion noch automiktische Züge aufweist.

Der Keimbahnchromosomenzyklus verläuft hier im Prinzip ähnlich, wie er für die bisexuellen Arten durch BAUER und BEERMANN beschrieben wurde. Doch konnten einige Fragen über das Verhalten der k-Chromosomen nicht völlig geklärt werden. Eliminationsteilungen, wie sie bei den bisexuellen Arten in den Urkeimzellen stattfinden, wurden trotz häufiger Suche nicht gefunden, auch keine heterochromatischen Eliminationskörper. Dennoch muß ein derartiger Vorgang in späteren Oogoniengenerationen, vielleicht in mehreren Schritten, vollzogen werden. Einen Hinweis darauf gibt die Tatsache, daß bei *Limnophyes virgo* neben Oogonienmetaphasen mit 15 Chromosomen, auch solche mit 12 Chromosomen gefunden wurden. Erstere Zahl (9 s. + 6 k-Chromosomen) entspricht dem vollen Satz, wie er in den Stadien der 1. Reifeteilung vorgefunden wird, letztere (9 s. + 3 k-Chromosomen) der reduzierten Anzahl der k-Elemente, wie sie bei den Differentialmitosen dieser Art fast immer auftritt.

Die Differentialmitose als Abschluß der Vermehrungsperiode der Oogonien gleicht in allen wesentlichen Zügen dem entsprechenden Vorgang bei den bisexuellen Arten. Die weitgehend heteropyknotischen k-Chromosomen treten nur bei *Limnophyes virgo* isoliert auf; sie sind bei den übrigen untersuchten Arten mehr oder weniger zu einer kompakten Masse verschmolzen. Die Zahl der k-Chromosomen scheint in

diesem Entwicklungsstadium zu variieren; bei *L. virgo* schwankt sie zwischen 2 und 4; die Fälle mit 3 sind am häufigsten. Eine Zahlenvariabilität der k-Chromosomen wurde auch von BAUER und BEERMANN (1952b) bei den bisexuellen Arten festgestellt und mit Unregelmäßigkeiten bei der Keimbahnelimination und der Differentialmitose erklärt.

Die Deutung der Prophasestadien zur 1. Reifeteilung macht Schwierigkeiten. Bei der Oogenese der bisexuellen Arten konnten BAUER und BEERMANN (1952b) in der 1. Reifeteilung chiasmatisch gepaarte Bivalente feststellen, woraus auf einen normalen Konjugationsverlauf bei den s-Chromosomen zu schließen ist. Bei den parthenogenetischen Arten tritt keine reguläre Paarung der s-Chromosomen ein. Die vorhandenen, wenn auch nicht regelmäßig vorkommenden Endbindungen von zwei Chromosomen können nicht auf frühzeitige Terminalisation von Chiasmen zurückgeführt werden. Ihr Zustandekommen konnte zwar im einzelnen nicht geklärt werden, doch ist es unmöglich, daß die besonders bei *Pseudosmittia arenaria arenaria* gefundenen variablen Paarungszustände auf Konjugationsprozesse zurückgehen (Abb. 11e). Für das Fehlen einer obligatorischen Paarung der s-Chromosomen spricht auch das zahlenmäßige Überwiegen der Univalente gegenüber den Zweiergruppen in der Metaphase I. Die in diesem Stadium auftretenden „Bivalente“ dürften, sofern sie zu den s-Chromosomen gehören, aus der Prophase übernommene zufällige Aggregationen darstellen. Diese Behauptung kann sich auf die Beobachtung der Vereinigung von Nicht-homologen und von mehr als 2 Elementen stützen (Abb. 12a, b). Gegen das Vorkommen von normaler Paarung und Chiasmenbildung sprechen auch die Verhältnisse bei *Limnophyes biverticillatus*. Drei Arme der Speicheldrüsenchromosomen sind heterozygot für lange große Inversionen. Chiasmenbildung in diesen heterozygoten Abschnitten sollte mindestens gelegentlich zu Brücken und Fragmenten führen, was aber nie beobachtet wurde. Gegen jedes Vorkommen von Rekombinationen spricht besonders auch die Konstanz des heterozygoten Musters der Speicheldrüsenchromosomen, die auch für alle Arten von röntgeninduzierten Mutationen bei *Smittia spec.* gilt (vergl. BAUER 1957).

Die Prophasenentwicklung der k-Chromosomen konnte nur bei *Pseudosmittia arenaria flava* beobachtet werden. Über die Anzahl der Einheiten läßt sich jedoch ebenso wie bei den s-Chromosomen dieses Stadiums keine Klarheit erzielen. Die Längsspaltung der k-Chromosomen ist sicherlich kein Paarungsphänomen. Aus den Differentialmitosen von *Limnophyes virgo* ist zu ersehen, daß ein Chromatidenspalt bereits in dieser Phase der Entwicklung vorhanden sein kann. Auch BAUER und BEERMANN (1952b) fanden in den Differentialmitosen der bisexuellen Arten stets gespaltene k-Chromosomen. Nach den Beobachtungen an

L. virgo ist es sicher, daß eine Verdoppelung der k-Elemente zwischen Differentialmitose und Metaphase I eintritt, so daß der Längsspalt in der Prophase I an den k-Chromosomen von *Pseudosmittia arenaria flava* diese Verdoppelung anzeigt und die Chromosomen bis zur Metaphase I entweder unter Beibehaltung einer terminalen Verklebung in bivalent-ähnliche Gebilde übergehen oder in 2 Univalente auseinander fallen, die sich weiterhin wie die ungepaarten s-Chromosomen verhalten.

Die 1. Reifeteilung führt bei keiner der untersuchten Arten zu einer Reduktion der Chromosomenzahl, da in der Telophase die Teilung nicht zu Ende geführt wird und sich die Chromosomen anschließend sämtlich zu einer gemeinsamen Anaphase der zweiten, mitotisch verlaufenden Reifeteilung wiedervereinigen.

Die unterschiedlichen Chromosomenzahlen in den Reifeteilungsstadien sind sehr wahrscheinlich das Resultat einer Variabilität der k-Chromosomenzahlen. Ob diese Variabilität die Entwicklungsfähigkeit der Eier beeinträchtigt, ist unbekannt. Es muß jedoch damit gerechnet werden, daß ein Mechanismus vorhanden ist, der eine allzugroße Schwankung der Zahl der k-Chromosomen ausschließt. Ungerade Zahlen von k-Chromosomen dürften in der Oocyte nach einer Verdoppelung der Elemente vor oder während der Prophase nicht vorkommen. Bei der Neigung der Chromosomen zu Verklebungen sind Zählungsfehler aber nicht auszuschließen. Sollte jedoch eine ungerade k-Chromosomenzahl in der Eireifung festgestellt werden, so müßte der Keimbahnchromosomenzyklus gestört sein, indem entweder in der Differentialmitose sich einzelne k-Chromosomen wie die s-Chromosomen mitotisch teilen oder, was weniger wahrscheinlich ist, sich nicht alle k-Chromosomen zwischen Differentialmitose und 1. Reifeteilung verdoppeln.

Das völlige Fehlen von k-Chromosomen bei 2 der untersuchten Arten könnte als Endergebnis einer Störung des komplizierten Keimbahnchromosomenzyklus angesehen werden. Daß diese Arten während der vierjährigen Zucht keine Vitalitätsminderung gegenüber den übrigen zeigten, spricht dafür, daß die ursprüngliche, ihrem Wesen nach unbekannte Wirkung der k-Elemente anderweitig kompensierbar ist. Das relativ häufige Fehlen der k-Chromosomen bei parthenogenetischen Arten (2 von 6) ist auffällig. Unter den zahlreichen untersuchten bisexuellen Arten ist dies nur von *Trichocladius triannulatus* bekannt (BEERMANN 1956).

Durch die im Ergebnis apomiktisch verlaufende Eireifung bleibt die Heterozygotie in den s-Chromosomen erhalten; jede weitere Mutation vergrößert sie noch. Anders ist es bei den k-Chromosomen. Ihre Zahl wird in der Keimbahn-Elimination reduziert. BAUER und BEERMANN (1952b) haben dabei keinen Mechanismus beobachtet, der die k-Elemente nach elterlicher Herkunft sortiert. Bei zufallsgemäßer Elimination muß des-

halb der k-Chromosomenbestand von Generation zu Generation an Mannigfaltigkeit einbüßen, so daß er schließlich nur noch gleiche Elemente enthalten würde. Dann ist aber ein Wegfall aller k-Chromosomen nur noch ein letzter Schritt des allmählichen Verlustes.

Zusammenfassung

1. Die Oogenese folgender Species und Subspecies parthenogenetischer *Orthocladinae* wurde untersucht (die k-Chromosomenzahlen sind die bei den Reifeteilungen beobachteten):

<i>Limnophyes biverticillatus</i> . . .	2 s = 6, keine k-Chromosomen
<i>Limnophyes virgo</i>	3 s = 9, meist 6—10 k-Chromosomen
<i>Pseudosmittia a. arenaria</i> . . .	2 s = 4, keine k-Chromosomen
<i>Pseudosmittia a. flava</i>	2 s = 4, meist 6 (4—8) k-Chromosomen
<i>Pseudosmittia baueri</i>	2 s = 4, ~30 k-Chromosomen
<i>Smittia spec.</i>	2 s = 6, ~30 k-Chromosomen

2. Die s-Chromosomen unterliegen in der Prophase der 1. Reifeteilung keiner regulären Paarung. Zufällige Aggregationen können Gruppenbildungen von 2 oder mehr Elementen bedingen. Univalente sind in diesem Stadium am häufigsten. In der Anaphase I wandern die Univalente und die aus den Aggregaten freiwerdenden Elemente zu beiden Polen. Die Verteilung ist zufallsgemäß. In der 2. Reifeteilung wird nur bei einer Art eine Metaphase durchlaufen. Bei den übrigen Arten beginnt die Anaphase II schon, wenn die Univalente noch ihre Telophase I-Anordnung haben. Während der Anaphase II ordnen sich die sich trennenden Chromatiden zu 2 Tochtergruppen mit vollständigem Chromosomenbestand um. Beide Tochterkerne nehmen an der Embryonalentwicklung teil.

3. Die Elimination der k-Chromosomen in der Keimbahn konnte nicht direkt beobachtet werden. In der Urkeimzelle tritt sie nicht auf. Unterschiedliche Chromosomenzahlen der Oogonien älterer Gonaden lassen auf eine später erfolgende Elimination schließen. Die Differentialmitose gleicht derjenigen der bisexuellen Arten. Danach verdoppelt sich die Zahl der k-Chromosomen. Bei den Reifeteilungen verhalten sich diese wie die s-Chromosomen.

Literatur

- BAUER, H.: Chromosomenstruktur und -funktion. Ergebnisse der Untersuchungen an Riesenchromosomen. Jb. Max-Planck-Ges. 1957, 23—39.
- BAUER, H., u. W. BEERMANN: Chromosomale Soma-Keimbahndifferenzierung bei Chironomiden. Naturwissenschaften 39, 22—23 (1952a). — Der Chromosomenzyklus der Orthocladinen (*Nematocera, Diptera*). Z. Naturforsch. 7b, 557 bis 563 (1952b).
- BEERMANN, W.: Chromomerenkonstanz und spezifische Modifikationen der Chromosomenstruktur in der Entwicklung und Organdifferenzierung von *Chirono-*

- mus tentans*. Chromosoma (Berl.) 5, 139—198 (1952). — Nuclear differentiation and functional morphology of chromosomes. Cold Spr. Harb. Symp. quant. Biol. 21, 217—230 (1956).
- REMMERT, H.: Substratbeschaffenheit und Salzgehalt als ökologische Faktoren der Dipteren. Zool. Jb., Abt. System., Ökol. u. Geogr. 83, 453—474 (1955).
- SCHOLL, H.: Die Chromosomen parthenogenetischer Mücken. Naturwiss. 43, 91—92 (1956).
- STRENZKE, K.: Terrestrische Chironomiden XIX—XXIII (Diptera: Chironomidae). Entomol. Z. 7, 414—441 (1960).
- SUOMALAINEN, E.: Parthenogenesis in animals. Advanc. Genet. 3, 193—253 (1950).
- THIENEMANN, A.: *Chironomus*. Leben, Verbreitung und wirtschaftliche Bedeutung der Chironomiden. Stuttgart: E. Schweizerbart 1954.
- WHITE, M. J. D.: Animal cytology and evolution, 2nd ed. Cambridge: Cambridge Press 1954.

Stud.-Ass. HANS SCHOLL,
Kreuzwertheim a. M., Bahnhofstr. 5a

From the Department of Zoology, Yale University, New Haven, Connecticut
THE CHROMOSOME CYCLE OF A PRIMITIVE CECIDOMYIID —
MYCOPHILA SPEYERI

By

R. BRUCE NICKLAS

With 22 Figures in the Text

(Received June 15, 1960)

A. Introduction

The evolutionary origin of a bizarre chromosome cycle from a more orthodox one is a refractory problem, but a direct approach to a clearer understanding exists. This is the cytological investigation of a species that on other grounds is considered to be a relatively primitive representative of the group of organisms possessing the unorthodox chromosome cycle. The first studies of a primitive representative of the dipteran family *Cecidomyiidae* are here reported.

The family *Cecidomyiidae* has usually been subdivided into the subfamilies *Lestremiinae*, *Heteropezinae*, and *Cecidomyiinae*. There is general agreement that on both ecological and morphological grounds the *lestremiines* are the most generalized and most primitive *cecidomyiids* (see e.g. FELT 1925, WHITE 1950). An important taxonomic revision of the *Heteropezinae* has recently been completed by PRITCHARD (1960). He does not retain this subfamily and distributes its members into three new *Lestremiinae* tribes and one new *Cecidomyiinae* tribe. This classification is here accepted, although it is recognized that most of the new *lestremiine* genera, including *Miastor* and *Heteropeza* (= *Oligarces*), are morphologically more specialized than other, more typical, *lestremiines*.

The chromosome cycles of two *Lestremiinae* genera — *Miastor* and *Heteropeza* — and several representatives of the *Cecidomyiinae* have been studied, particularly by KAHLE, KRACZKIEWICZ, REITBERGER and WHITE. They have demonstrated that the following bizarre features are shared by all these *cecidomyiids*: (1) the germ-line cells have a high chromosome number, (2) chromosome elimination in early cleavage reduces the chromosome number in future somatic nuclei to a level characteristic of the *Diptera* in general, and (3) meiosis is modified in both sexes.

The subject of this report — *Mycophila speyeri* — is morphologically a representative member of the *lestremiine* tribe *Micromyini* (PRITCHARD, personal communication). The *Micromyini* have always been classified as *Lestremiinae* and are typical members of this subfamily. *Mycophila*

shares with more specialized forms like *Miastor* and *Heteropeza* (tribes *Miastorini* and *Heteropezini*, respectively) the biological characteristic of paedogenesis. *Mycophila speyeri* is easily obtained and was chosen for that reason. However, the very rare and cytologically unknown catotrichine lestreminiines constitute the most generalized cecidomyiids.

We shall be here concerned with the cytology of the paedogenetic larvae and with meiosis in sexual males and females. The results make possible the first suggestions concerning the evolution of the cecidomyiid chromosome cycle. Certain aspects of *Mycophila* cytology also raise interesting cytological problems concerning the regulation of chromosome number and the mechanisms of chromosome elimination.

B. Material and methods

Mycophila speyeri was obtained from Dr. C. A. THOMAS of Pennsylvania State University at Kennett Square. I am indebted to Dr. THOMAS for his generosity and also to Dr. A. EARL PRITCHARD of the University of California at Berkeley for an authoritative identification of the species.

The material used was from laboratory cultures; initially the food source was mushroom spawn kindly supplied by the Swain Spawn Company of Kennett Square, Pennsylvania, while recently the animals have been reared by the more convenient ULRICH (1936) malt broth method using Nikolei's "unidentified basidiomycete" as the food source (NIKOLEI 1959). The paedogenetic female generation time is approximately 4 days at 25° C, and 1 to 1½ days after hatching the larvae contain early cleavage embryos. Weekly subculturing to fresh media provides a continuous supply of paedogenetic females. Sexual forms are readily obtained by simply allowing the cultures to grow older. Thus, about 12 days after the initial inoculation of the culture with young larvae, female pupae and adults are present, and at this time one also finds females containing young male larvae. If these male-mothers are transferred to fresh media, the male larvae hatch and mature. The various male meiotic stages are found in late prepupae to young pupae, while female meiotic stages are found in eggs from late pupae and imagoes. As in other cecidomyiids, female sexual meiosis usually stops at metaphase I until after fertilization. However, in *Mycophila*, later stages are easily obtained simply by dissecting eggs from imagoes into Beadle and Ephrussi Ringer's (diluted 2:1 with distilled water) and allowing them to stand 10 to 30 minutes before fixation.

The studies of the chromosome cycle of paedogenetic females and sexual female meiosis utilized the Feulgen squash and whole mount methods previously described (NICKLAS 1959). Male meiosis was studied in sectioned material prepared as follows: prepupae and pupae were torn apart in air to expose the testes and immediately transferred to Sanfelice. They were subsequently embedded in paraffin, sectioned at five microns, and stained by the Feulgen method.

C. Observations

I. Chromosome number and morphology

Here, as in all other cytologically known cecidomyiids, the germ-line nuclei have a large number of chromosomes, and the majority of these chromosomes are lost from future somatic nuclei during early cleavage.

1. The germ-line chromosomes

The germ-line number of chromosomes is invariably 29 as determined from seven clear metaphases from five paedogenetic female embryos. All these chromosomes are about the same size and all have median or submedian kinetochores (Fig. 1).

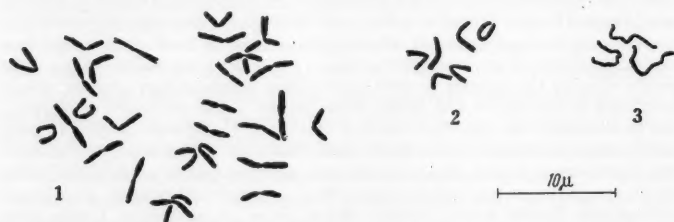
Table 1. *Material used to establish the female somatic chromosome number*

Stage	Number of embryos	Number of metaphases scored
Cleavage V	8	35
Mid-cleavage	2	7
Advanced embryos (after somite formation)	10	22
Totals	20	64

2. Somatic chromosomes of the female

Somatic metaphases in females always show 6 chromosomes, all of which have median or submedian kinetochores (Fig. 2). The number of metaphases analyzed to verify this numerical

constancy, is given in Table 1. Somatic pairing is seen in metaphases from the older embryos, and therefore these 6 chromosomes constitute the somatic diploid number.



Figs. 1—3. Feulgen squashes. Fig. 1. Germ-line metaphase from a female embryo showing 29 chromosomes. Fig. 2. Female somatic metaphase showing 6 chromosomes. Fig. 3. Male somatic metaphase showing 3 chromosomes

3. Somatic chromosomes of the male

Mycophila males have 3 chromosomes in their somatic cells (Fig. 3). The male soma of other paedogenetic cecidomyiids is also haploid (*Miastor*: WHITE 1946, *Heteropeza*: HAUSCHTECK 1959).

II. The chromosome cycle of paedogenetic females

The similarity of chromosome behavior in *Mycophila* to that of cytologically well-known cecidomyiids is so great that several features will merely be enumerated in section 1, while the processes of chromosome elimination will be described in detail in section 2.

1. General description

The paedogenetic females contain 10 to 20 embryos which begin parthenogenetic development following a single equational maturation division. The single polar body never shows more than one abortive division and invariably degenerates.

Parenthetical mention may be made of the presence in most young embryos of a single somatic nucleus showing 6 chromosomes. Its origin is obscure, but it is already present at the maturation division metaphase, and it shows no relationship to the oocyte nucleus or its derivatives. It sometimes divides once, usually abortively. This nucleus or its two derivatives can be followed up to Cleavage VI where they are represented only by scattered chromosomes. From counts on the number of somatic nuclei present at Cleavage V (six embryos counted) it is clear that this nucleus or its derivatives never give rise to embryonic nuclei. There is an interesting similarity between these somatic nuclei and the so-called "secondary nuclei" found in the oocytes of Hymenoptera (see WILSON 1925, pp. 346—348 for description and references).

Chromosome behavior in Cleavages I through III is completely normal, and as described for *Heteropeza* (REITBERGER 1939) and *Miastor* (NICKLAS 1959). In *Mycophila*, elimination never occurs before or at Cleavage III (20 embryos checked). The primordial germ-cell is segregated in the posterior cytoplasm at Cleavage III, and chromosome elimination from the seven future somatic nuclei takes place at Cleavage IV.

By the end of blastulation four primordial germ-cells are present. As in other cecidomyiids these contain heteropycnotic areas. In *Mycophila* these areas are toward the periphery of the nucleus, and not central as they are in other forms (Fig. 4).

2. Chromosome elimination

The time and general pattern of chromosome elimination are indicated above; I shall here give the details of this process and consider some exceptions to the usual course of events.

a) Cytological description of the elimination processes

The most common type of chromosome elimination in *Mycophila* is so similar to that seen in Cleavage IV in *Heteropeza* (REITBERGER 1939) and *Miastor* (NICKLAS 1959) that a very brief description will suffice. All chromosomes behave normally until after the initial separation of daughter chromosomes in early elimination anaphase. However, only



Fig. 4. Feulgen whole mount. Female germ-line nucleus from a mid-blastula embryo

six chromosomes continue to move toward each pole, while the rest of the complement remains at the equator and eventually undergoes pycnotic degeneration in the cytoplasm. A mid-anaphase is illustrated in Fig. 5 in which the six normally behaving chromosomes are well shown as is the uniform failure of mid-anaphase movement in the eliminated chromosomes. This pattern is designated "type 1" for convenience. Noteworthy is the presence here, as in *Miastor*, of chromatid pairs that remain separate and yet fail to evince any mid-anaphase movement — see particularly the pair at the left in the illustration.

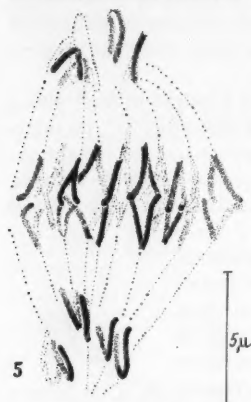
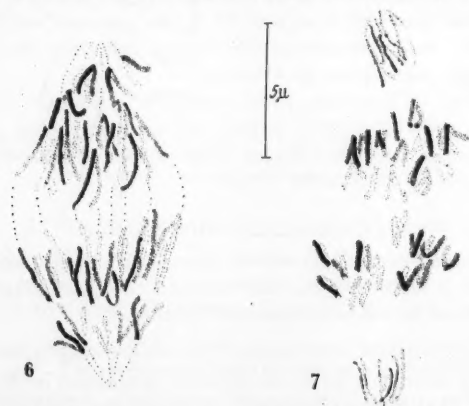


Fig. 5. Feulgen whole mount. Type 1 elimination in mid-anaphase of Cleavage IV. Not all of the eliminated chromosomes are shown

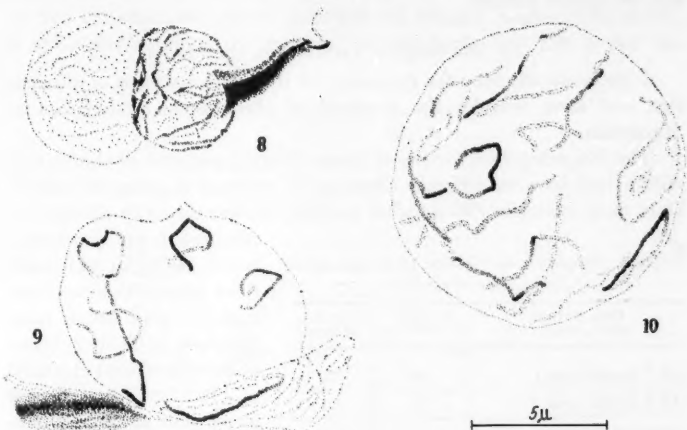
Mycophila displays a second pattern of chromosome elimination, which is not as frequent as type 1, and which has not been noted in any other organism. Its chief characteristic is the variable amount of mid-anaphase movement in the chromosomes usually eliminated; but in any one anaphase this amount of movement is the same for all chromosomes. Thus one sees mid-anaphases with a group of six chromosomes leading the way to the poles followed by the remaining



Figs. 6 and 7. Feulgen whole mounts. Type 2 elimination in Cleavage IV. Not all of the eliminated chromosomes are shown. Fig. 6. Mid-anaphase. Fig. 7. Telophase

chromosomes, which lag behind as a group (Fig. 6). The separation between the six chromosomes moving normally and the laggards increases

during anaphase, so that late anaphases show two daughter nuclei with two groups of eliminated chromosomes between them (Fig. 7). The uniformity of behavior in the eliminated chromosomes is as striking here as in earlier anaphase. This pattern of elimination is designated "type 2" for convenience in the subsequent discussion. At the completion of anaphase the amount of separation between the eliminated chromosomes and the somatic chromosomes, while uniform in one division figure, is



Figs. 8—10. Feulgen whole mounts. Type 2 elimination. Fig. 8. Interphase after Cleavage IV. Figs 9 and 10. Cleavage V prophase. See text for details

not the same in all anaphases of this type. Thus we see a continuous spectrum from type 1 elimination to no elimination at all.

In the more extreme examples of type 2 elimination, two nuclei are formed at each pole in Cleavage IV telophase, one of which contains the six normal chromosomes, while the other contains the laggards. When these two nuclei increase in size during interphase, they often come into contact. Such a condition is shown in Fig. 8. (Note that Figs. 8, 9 and 10 show only one of the two daughter groups formed by the division of a Cleavage IV nucleus.) Fig. 8 shows, from left to right: (1) the nucleus formed from six normal chromosomes; (2) the slightly heteropycnotic nucleus formed from the laggards; and (3) a heteropycnotic mass formed from the chromosomes or parts of chromosomes that showed the greatest amount of lag. Note that there is no fusion between the two nuclei, even though they overlap. Elimination is perfect in such cases, for the laggards, in spite of their proximity to the future somatic chromosomes do not behave normally at Cleavage V. This is shown in Fig. 9, where the six somatic chromosomes show normal

prophase condensation, while the laggards (below) remain in a pycnotic interphase state. Thus elimination is complete and precise even after the more extreme forms of type 2 behaviour at Cleavage IV. However, in the most extreme expression of this type elimination is incomplete — if the chromosomes usually eliminated show little or no lag they will behave like other chromosomes at least through the Cleavage V prophase. This is illustrated in Fig. 10, in which about 18 chromosomes are present and all appear normal.

b) The range of variation in elimination

I shall now describe the frequency of these two patterns of elimination and then consider the precision of chromosome elimination in *Mycophila*.

The frequency distribution of these differing patterns of elimination within and between different Cleavage IV embryos is given in Table 2. Only clear examples are included, and the extreme examples showing no

Table 2. *Frequency distribution of the two types of chromosome elimination*

Distribution within embryo	Number of embryos	Per cent of total
All 7 nuclei type 1 . . .	6	35
All 7 nuclei type 2 . . .	6	35
Anterior 6 type 1; nucleus No. 7 type 2 .	4	24
Anterior 4 type 1; posterior 3 type 2 . .	1	6
Total	17	100

elimination are considered below. Seven nuclei usually show elimination at Cleavage IV, and hence from the data in Table 2 it can be calculated that in a total of 119 elimination figures 59 per cent are type 1. However, 65 per cent of the embryos show type 2 elimination in at least one nucleus. As is indicated in the table, this nucleus is invari-

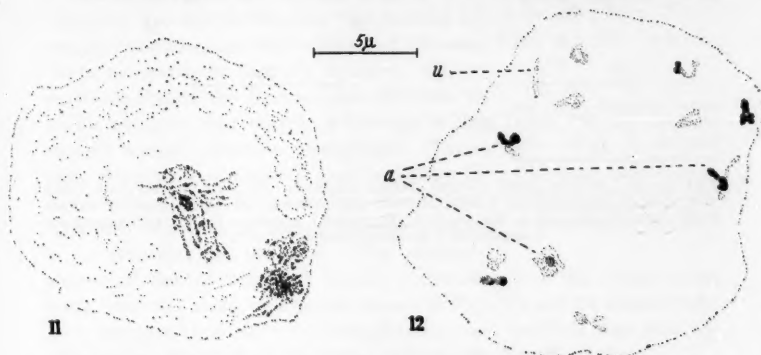
ably the most posterior of the future somatic nuclei. This relation between position and variable elimination behavior is also found in *Miastor* (in Cleavage III; NICKLAS 1959).

As to the degree of precision of elimination, two observations are of cardinal importance. First, elimination occurs only at Cleavage IV. This is verified by the absence of elimination figures before or after that time in more than fifty embryos examined. Second, cytologically normal somatic metaphases never contain more than 6 chromosomes. It is clear, however, that division at Cleavage IV with little chromosome loss does occur. This was determined in 25 Cleavage IV embryos in which the elimination behavior was clearly analyzable. 80 per cent of these showed complete elimination in all somatic nuclei; 12 per cent showed incomplete elimination in the derivatives of the most posterior somatic nucleus, and 8 per cent showed incomplete elimination in four

or more future somatic nuclei. Since all somatic nuclei of surviving embryos show 6 chromosomes and since elimination does not occur after Cleavage IV, it is clear that somatic nuclei with elevated chromosome number must degenerate. Embryos with more than a few such hyperdiploid nuclei probably die.

III. Meiosis in sexual females

The chromosome cycle of paedogenetic females, as described above, is quite unexceptional by cecidomyiid standards, but this is not the

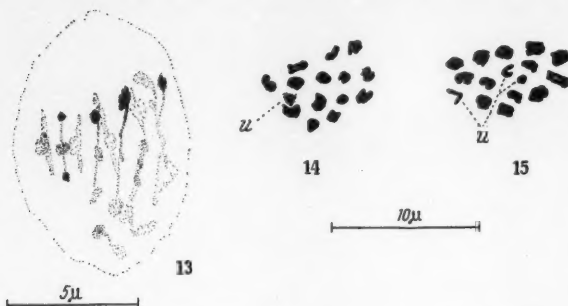


Figs. 11 and 12. Feulgen whole mounts. Sexual oogenesis. Fig. 11. Confused stage. Fig. 12. Diakinesis. Univalent designated by "u", aggregates by "a"

case for meiosis in sexual females. The surprising findings can be succinctly stated — sexual meiosis is completely orthodox in *Mycophila speyeri* females.

The earliest stage studied is the end of the growth stage when recondensation of chromosomes is just beginning (Fig. 11). As in the earlier germ-line nuclei (Fig. 4), the nucleus is divided into heteropycnotic areas and areas of diffuse chromatin. The heteropycnotic areas are usually two in number: one peripheral and one central. The progression to diakinesis is characterized by the condensation of the diffuse chromatin and the resolution of the heteropycnotic areas, usually giving rise to 14 bivalents and 1 univalent, as seen in Fig. 12. It will be noted that loose associations of 6 bivalents into 3 aggregates are still present at the mid-diakinesis stage shown. These are later resolved, and the typical bivalent structure made manifest during premetaphase I as shown in Fig. 13. This illustration also demonstrates the clear premetaphase stretch encountered in *Mycophila* oogenesis.

Since the germ-line number of chromosomes is 29, one would expect to find 14 bivalents and 1 univalent if pairing is complete. This is generally the case, as determined by analysis of polar views of metaphase I. Occasionally, however, pairing is not present in one of the



Figs. 13—15. Feulgen whole mounts. Sexual oogenesis. Fig. 13. Premetaphase I side view showing premetaphase stretch. Not all the bivalents are shown. Figs. 14 and 15. Polar views of metaphase I. Fig. 14. 14 bivalents and 1 univalent. Fig. 15. 13 bivalents and 3 univalents. Univalents designated by "u"



Figs. 16 and 17. Feulgen whole mounts. Sexual oogenesis. Side views of metaphase I and anaphase I respectively. Not all bivalents are shown

fourteen pairs of homologues, and hence 13 bivalents and three univalents are present. Examples of these are shown in Figs. 14 and 15, respectively. The frequency for a total of 9 clear examples is 89 per cent $14+1$ and 11 per cent $13+3$. Multivalent formation was never observed. Side views of metaphase (Fig. 16) and early anaphase (Fig. 17) demonstrate conclusively the bivalent nature of these units, and also indicate that the univalent (toward the lower pole in both Figs.) lies off the plate and segregates precociously and without division at anaphase I.

The orthodox segregation at anaphase I is demonstrated by counts of late anaphase groups such as those shown in Fig. 18. Thus one group

shows 14 and the other 15 chromosomes. It is likely that in *Mycophila* as in many animals the products of the oocyte divisions are arranged in roughly linear order and the innermost nucleus becomes the female pronucleus. It is of interest to note that the segregation of the coordinated univalent is random with respect to inner or outer nuclei. This was checked at metaphase and anaphase I in a total of 14 eggs — in 6 the univalent would have segregated to the inner (secondary oocyte) nucleus; and in 8 it would have segregated to the outer (first polar body) nucleus.

As noted above, the meiotic divisions were obtained not by fertilization but instead by simply removing eggs from adults and allowing them to stand in Ringer's solution. Under such conditions the first meiotic division is easily obtained, but only in a few eggs is the second meiotic division completed. Three eggs showing a reasonably clear anaphase II have been found, however, and they show unequivocally that the second meiotic division is as orthodox as the first. The chromosomes of the presumptive female pronucleus and the second polar body from the same embryo are shown in Figs. 19 and 20 respectively. It is not easy to analyze such anaphase groups, but it is clear that approximately 14 to 15 chromosomes are present in both of them.

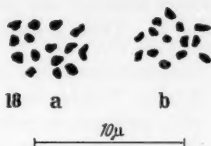


Fig. 18. Feulgen whole mount. Sexual oogenesis. Polar views of the late anaphase I chromosomes. a Secondary oocyte chromosomes. b First polar body chromosomes. 15 and 14 chromosomes respectively



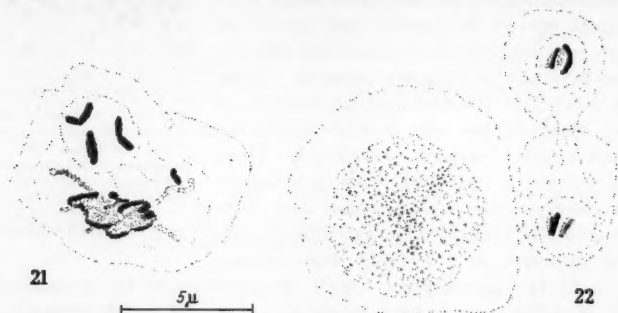
Figs. 19 and 20. Feulgen whole mount. Sexual oogenesis. Anaphase II. Polar views of the female pronucleus and second polar body chromosomes respectively. From a single oocyte. Approximately 15 chromosomes in each

Emphasis should be placed on the lack of differential behavior of any one group of chromosomes during oogenesis. All the chromosomes behave alike except for the heteropycnosis in the early prophases.

IV. Spermatogenesis

A detailed account of spermatogenesis in *Mycophila* will be given in a separate paper, but the major features have been established and can be recounted here. It is clear that spermatogenesis in *Mycophila* follows the typical cecidomyiid pattern, and hence is highly bizarre.

Chromosome pairing is absent in prophase I, and no true metaphase is formed. From a loosely aggregated mass of chromosomes 3 chromosomes separate and move toward a single pole. This is clearly seen in Fig. 21. These 3 motile chromosomes are segregated into a small cell



Figs. 21 and 22. Sanfelice; Feulgen; 5 μ . Spermatogenesis. Fig. 21. Slightly oblique view of anaphase I. Fig. 22. Side view of anaphase II (right) and large non-dividing cell (left)

while the large mass of non-motile chromosomes remains behind in a large cell. These relations, and the subsequent behavior of the small cell are shown in Fig. 22. The large cell with a diffuse interphase nucleus is at the left, and the anaphase of the second meiotic division in the small cell is seen on the right. The large cell eventually degenerates, and one spermatozoan containing 3 chromosomes is formed from each of the products of the second meiotic division of the small cell.

D. Discussion

The cytological implications of the observations will be considered first, in discussions of chromosome behavior in elimination and in male and sexual female meiosis. Secondly, the evolution of the cecidomyiid chromosome cycle will be considered.

1. Chromosome elimination

Two observations are of particular interest: (1) chromosome elimination does exist in *Mycophila*, and (2) the process of elimination is often identical with that seen in other forms, although a new variant of this

process has also been observed. The elimination processes thus far described in the cecidomyiids are of three types. These are cytologically distinguishable only by the behavior during and after mid-anaphase of the elimination cleavage of the chromosomes usually eliminated — all chromosomes behave normally before then, and at least a normal somatic number behave normally throughout anaphase. The types may be briefly described as follows: type 1 — the eliminated chromosomes completely and uniformly fail to move at anaphase, and without exception only a normal somatic complement reaches each pole; type 2 — as in type 1, all the abnormal chromosomes behave alike, although they do not remain at the equator but evince a certain amount of mid-anaphase movement which varies between different figures from almost equal to the somatic set to only a small amount of separation of daughter chromatids; type 3 — here there is great variability in the behavior of individual chromosomes, and at the end of anaphase chromosomes are scattered from the equator to the poles. Two and three are the more variable types in that their extreme expression results in an elevated somatic chromosome number, while this never happens with the more stable type 1. In spite of their cytologically distinctive features all these types of chromosome elimination may be regarded as simple variants of each other, as has already been demonstrated experimentally for types 1 and 3 (NICKLAS 1959). The pattern first described in this report — type 2 — is therefore regarded as caused by the same failure of the forces producing mid-anaphase tension shown to characterize types 1 and 3 (NICKLAS 1959); indeed type 2 furnishes additional evidence that this is so.

The distribution of these types of chromosome elimination in the cecidomyiids is summarized in Table 3.

Table 3. Patterns of chromosome elimination in the Cecidomyiidae

Genus	Elimination at cleavage				Type of elimination	Authority
	III	IV	V	VI to VIII		
<i>Heteropeza</i>		X			Type 1	REITBERGER 1939
				X	Type 3 followed by Type 1	
<i>Miastor</i>	X				Type 3	NICKLAS 1959
		X			Type 1	
<i>Monarthropalpus</i>			X		Type 1	WHITE 1950
<i>Mycophila</i>		X			Types 1 and 2	This report

It is evident that all these forms possess the one type of elimination which ensures a normal number of somatic chromosomes — type 1.

Only in *Mycophila* is a variable type not followed in a subsequent cleavage by type 1. As demonstrated above, however, this variability in *Mycophila* is more apparent than real, since most embryos show completely effective elimination even if the chromosomes to be eliminated move nearly as far toward the poles as the somatic chromosomes. In *Mycophila*, as in the other cecidomyiids, all embryos that survive show a normal number of somatic chromosomes in all their somatic nuclei.

II. Meiosis in sexual females and in males

The most unexpected finding in this study is the completely normal behavior of chromosomes in oogenesis of sexual females. Pairing, bivalent formation, and segregation are all normal, and even the orientation and segregation of the univalent is orthodox. Cytological distinctions between groups of chromosomes, so striking in cleavage and male meiosis, are therefore lacking in sexual oogenesis. The observations on sexual meiosis raise the interesting question of the regulation of chromosome number in the progeny, since the zygote nucleus will contain 17 to 18 chromosomes (the male pronucleus will contain 3 chromosomes, the female pronucleus 14 to 15 chromosomes) rather than 29 chromosomes as in females of parthenogenetic origin. Technical difficulties have thus far prevented an attack on this problem. Compensatory increase in chromosome number also occurs in male embryos in *Heteropeza*, but again the mechanism of the regulation is unclear (HAUSCHTECK 1959).

III. The evolution of the cecidomyiid chromosome cycle

The chromosome cycles of 14 species of cecidomyiids are well enough established to be of value for comparative purposes. These species are listed in Table 4. This table indicates the taxonomic position of these cecidomyiids as modified by PRITCHARD (1960).

The cardinal generalization about all of these species is the presence of chromosome elimination — either directly demonstrated or deduced from a higher chromosome number in the germ-line as compared with the soma. It should be remembered that this is associated with an elevated number of chromosomes in the germ-line by comparison with other Diptera. Therefore both an elevated chromosome number and the elimination of many chromosomes from future somatic nuclei are here regarded as characteristics of the central stock which gave rise to all the living forms.

It is more difficult to deduce the probable characteristics of sexual meiosis in the ancestral stock because of the paucity of reliable cytological information on living forms; *Mycophila* is the *only* species in which oogenesis is known beyond the first meiotic metaphase. It is already clear, however, that differences exist between *Mycophila* and the four

Table 4. *Cecidomyiidae with known chromosome cycles*

Subfamily	Tribe	Genus and species	Cytological authority
<i>Lestremiinae</i>	<i>Micromyiini</i>	<i>Mycophila speyeri</i>	This report
	"	<i>Miastor metralqas</i>	KARCZKIEWICZ 1936, 1937, 1938
	<i>Miastorini</i>	<i>Miastor sp.</i>	WHITE 1946
		<i>Miastor sp.</i>	NICKLAS 1959
	<i>Heteropezini</i>	<i>Heteropeza paradoxus</i>	REITBERGER 1939; HAUSCHTECK 1959
<i>Cecidomyiinae</i>	<i>Oligotrophini</i>	<i>Taxomyia taxi</i>	WHITE 1947
		<i>Phytophaga celliphylia</i>	WHITE 1950
		<i>Rhopalomyia sabinae</i>	
		<i>Oligotrophus pattersoni</i>	
	<i>Lasiopterini</i>	<i>Lasioptera asterspinosae</i>	WHITE 1950
		<i>Lasioptera rubi</i>	KRACZKIEWICZ 1950
	<i>Asphondyliini</i>	<i>Asphondylia monacha</i>	WHITE 1950
	<i>Cecidomyiini</i>	<i>Trishormomyia helianthi</i>	WHITE 1950
		<i>Monarthropalpus buxi</i>	

species of the subfamily *Cecidomyiinae* in which oogenesis has been studied (WHITE 1950). In *Mycophila*, all chromosomes are paired except for the univalent and in rare cases, one pair of homologues, while in the *Cecidomyiinae* only a somatic haploid number of bivalents are present and the remaining chromosomes are unpaired. I regard *Mycophila* oogenesis as the primitive cecidomyiid type because the oogenesis itself is orthodox and also because *Mycophila* is on other grounds the most primitive of these cecidomyiids.

Male meiosis has been studied in eleven cecidomyiids to date. Spermatogenesis in both subfamilies is characterized by the segregation of a somatic haploid number of chromosomes at the first division which are equationally divided at the second, although two exceptions have been noted (*Oligotrophus pattersoni* and *Monarthropalpus buxi*; WHITE 1950). It therefore seems reasonable to assume that this modification of meiosis is more primitive than any oogenetic modification and was present in the ancestral stock.

Thus the postulated cytological characteristics of the ancestral cecidomyiid stock are high chromosome number, chromosome elimination from future somatic cells, a modified male meiosis such that only a very few chromosomes are transmitted by the sperm, and an essentially orthodox female meiosis. Our present knowledge of cecidomyiid cytology supports this view. It is appropriate, therefore, to consider why chromosome elimination in cleavage and male meiosis is so

intimately associated with elevated chromosome number in the cecidomyiids. A likely explanation is not hard to find, for increases in chromosome number can be shown to have highly deleterious effects on animal development even if genic balance is maintained (reviewed by FANKHAUSER 1955). As STEBBINS (1950, p. 369) among others has pointed out, the lethal effects of such changes in nucleo-cytoplasmic ratio may be an important reason for the lack of polyploid series in most animal groups. This may be of particular importance in the Diptera, whose developmental pattern has long been adjusted to a low number of chromosomes in relatively small nuclei. It is significant that, in *Miastor*, experimental prevention of chromosome elimination inevitably leads to the death of the embryo (NICKLAS 1959), and apparently the occasional failure of elimination observed in *Mycophila* also has this result. My conclusion is that chromosome elimination from most nuclei in cleavage was therefore a modification essential for the persistence of dipterans with a much increased chromosome number. The same argument applies to sperm formation, but not to oogenesis and early development since increased nuclear size at these stages has relatively little effect on nucleo-cytoplasmic ratio because of the very large cytoplasmic volume of the egg cell. Thus chromosome elimination in cleavage and spermatogenesis is seen as making survival possible in spite of a much elevated chromosome number, while the modifications of female meiosis in the subfamily *Cecidomyiinae* are viewed as secondary adaptations probably related to regulation of chromosome number in oogenesis rather than in early cleavage as in the *Lestremiinae*.

The above views make the higher chromosome number a crucial cytological difference separating the primitive cecidomyiid stock from their antecedents. Therefore it is appropriate to ask how this elevated number arose. My suggestion is that it arose by polyploidy in a facultatively parthenogenetic stem stock. This postulate is made because it is the simplest explanation of the origin of the relatively high cecidomyiid chromosome number, and the pros and cons of a parthenogenetic stem stock will be deferred until more information on the primitive living forms and cecidomyiid genetics is available. It may be pointed out, however, that an almost unique form of facultative parthenogenesis — paedogenesis — is known not only in four *Lestremiinae* tribes, but also in one *Cecidomyiinae* tribe. It is therefore plausible that strict bisexuality has a multiple origin from a facultative parthenogenetic stock, rather than the reverse.

Note added in proof. B. MATUSZEWSKI [Bull. Acad. Sci. Poland 8, 101—104 (1960)] has recently reported the first analysis of the oögenetic anaphases in the more specialized cecidomyiids (subfamily *Cecidomyiinae*). This work makes clearer the great divergence from the orthodox meiotic pattern, as found in *Mycophila*, which has taken place during the evolution of the cecidomyiid chromosome cycle.

Summary

1. The chromosome cycle of the primitive cecidomyiid *Mycophila speyeri* has three features also found in more specialized cecidomyiids: a large number of chromosomes in the germ-line, chromosome elimination from future somatic cells, and chromosome elimination in spermatogenesis. However, sexual oogenesis lacks the unusual features found in other cecidomyiids, and instead there is normal chromosome pairing and segregation. The studies on male and female meiosis suggest that sexual progeny begin development with fewer chromosomes than their parents possessed, and therefore a compensatory increase in chromosome number probably occurs during early cleavage in sexual progeny.

2. Two cytologically distinguishable patterns of chromosome elimination in cleavage are described, one of which has not been reported previously.

3. The evolutionary origin of the cecidomyiid chromosome cycle is discussed in the light of these results. It is concluded that the essential innovation in the ancestral group was an increase in chromosome number, possibly by polyploidy, and that chromosome elimination in cleavage and spermatogenesis made possible the perpetuation of this elevated chromosome number. Modifications of oogenesis are viewed as secondary adaptations not present in the early cecidomyiid stock.

References cited

- FANKHAUSER, G.: The role of nucleus and cytoplasm. In: Analysis of development (eds. WILLIER *et al.*), pp. 126—150. Philadelphia: W. B. Saunders Company 1955.
- FELT, E. P.: Key to gall midges. Bull. N. Y. St. Mus. No 257, pp. 1—239 (1925).
- HAUSCHTECK, E.: Über die Zytologie der Parthogenese und der Geschlechtsbestimmung bei der Gallmücke *Oligarces paradoxus* MEIN. *Experientia* (Basel) 15, 260—264 (1959).
- KRACZKIEWICZ, Z.: Etudes cytologiques sur l'oogénèse et la diminution de la chromatine dans les larves paédogénétiques de *Miastor metraloas* MEINERT (*Diptera*). *Folia morph.* (Warszawa) 6, 1—40 (1936). — Recherches cytologiques sur le cycle évolutif de *Miastor metraloas*. *Cellule* 46, 57—74 (1937). — La spermatogénèse chez *Miastor metraloas* (*Cecidomyiidae*, *Diptera*). *C. R. Soc. Biol. (Paris)* 127, 1143—1146 (1938). — Recherches cytologiques sur les chromosomes de *Lasioplera rubi* HEGG. (*Cecidomyiidae*). *Zool. Polon.* 5, 73—117 (1950).
- NICKLAS, R. B.: An experimental and descriptive study of chromosome elimination in *Miastor spec.* (*Cecidomyiidae*, *Diptera*). *Chromosoma* (Berl.) 10 301—336 (1959).
- NIKOLEI, E.: Untersuchungen über den Generationswechsel pädogenetischer Gallmücken. *Rev. suisse Zool.* 65, 390—396 (1959).
- PRITCHARD, A. E.: *Ann. entomol. Soc. Amer.* (in press 1960).
- REITBERGER, A.: Die Cytologie des paédogenetischen Entwicklungszyklus der Gallmücke *Oligarces paradoxus* MEIN. *Chromosoma* (Berl.) 1, 391—473 (1939).

- STEBBINS, G. L.: Variation and evolution in plants. New York: Columbia Univ. Press 1950.
- ULRICH, H.: Experimentelle Untersuchungen über den Generationswechsel der heterogenen Cecidomyide *Oligarces paradoxus*. Z. induct. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre 71, 1—60 (1936).
- WHITE, M. J. D.: The cytology of the *Cecidomyiidae* (Diptera). II. The chromosome cycle and anomalous spermatogenesis of *Miastor*. J. Morph. 79, 323 to 370 (1946). — III. The spermatogenesis of *Taxomyia taxi*. J. Morph. 80, 1—24 (1947). — Cytological studies on gall midges (*Cecidomyiidae*). Univ. Texas Publ. No 5007 (1950).
- WILSON, E. B.: The cell in development and heredity, 3rd edit. New York: Macmillan 1925.

Dr. BRUCE NICKLAS,
Osborn Zoological Laboratories, Yale University,
New Haven, Connecticut, U.S.A.

Aus dem Zoologischen Institut der Universität München
(Vorstand: Prof. Dr. H. AUTRUM)

UNTERSUCHUNGEN ÜBER GESCHLECHTSBESTIMMUNGS- MECHANISMEN BEI COPEPODEN

Von

MARIA-ELISABETH RÜSCH

Mit 15 Textabbildungen

(Eingegangen am 23. April 1960)

I. Einleitung

Unter den Wirbellosen sind Geschlechtschromosomen verbunden mit weiblicher Heterogametie außer bei Lepidopteren von einigen Crustaceen bekannt geworden. Speziell von den Süßwasser-Cyclopiden, einer Familie der Copepoden, bei denen es sich um besonders klare und übersichtliche Chromosomenverhältnisse handelt, berichten schon ältere Autoren (BRAUN 1909, MATSCHECK 1910, AMMA 1911) über ungerade Chromosomenzahlen im weiblichen Geschlecht. Da jene Autoren jedoch ihr Augenmerk auf andere Probleme gerichtet hatten wie z. B. die Bedeutung des primären und sekundären Längsspalt und der „Querkerbe“ der Metaphasechromosomen und außerdem eine Untersuchung der Spermatogenese der betreffenden Tiere unterblieb, wurde die Wichtigkeit dieser „Heterochromosomen“ nicht erkannt.

Erst 1954 griff BEERMANN diese Frage wieder auf und konnte durch Untersuchungen der Oo- und Spermatogenese erstmals an einem Cyclopiden, *Ectocyclops strenzkei* HERBST, einen einwandfreien Fall von weiblicher Heterogametie vom X-O-Typ feststellen. 1957 erschien eine Arbeit von METZLER: „Über die Beeinflussbarkeit des Geschlechtsverhältnisses von *Cyclops viridis* JURINE durch Außenfaktoren“. Entgegen den Angaben von TAKEDA und EGAMI, die beide bei dem marinen Copepoden *Tigriopus japonicus* MORI experimentell phänotypische Geschlechtsbestimmung nachgewiesen haben, fand METZLER, daß das Geschlecht von *Cyclops viridis* mit der Eiablage fixiert ist. Das Geschlechtsverhältnis der Nachkommen konnte nur durch Behandlung der Weibchen verändert werden. Aus diesen ihren Ergebnissen schloß METZLER bei *Cyclops viridis* auf genotypische Geschlechtsbestimmung mit weiblicher Heterogametie.

Meine Aufgabe war es nun, die Cytologie des Geschlechtsbestimmungsmechanismus von *Megacyclops viridis* JURINE und einigen anderen Cyclopiden zu untersuchen. Von den unten aufgeführten

Copepoden liegen mit Ausnahme von *Megacyclops viridis* keine Angaben über experimentelle Beeinflussung des Geschlechtsverhältnisses vor.

Frau Privatdozentin Dr. M. VON DEHN möchte ich für die Anregung zu dieser Arbeit sowie für ihre stete Hilfe sehr herzlich danken. Herrn Professor Dr. K. VON FRISCH und Herrn Professor Dr. H. AUTRUM danke ich für die Überlassung eines Arbeitsplatzes im Zoologischen Institut München.

II. Material und Methode

Megacyclops viridis fand ich in den Becken des Münchner Institutgartens; daneben wurde die gleiche Art aus dem Botanischen Garten in Bonn und aus einem größeren Teich bei Vorst/Rhld. zu Untersuchungen herangezogen.

*Acanthocyclops robustus*¹ konnte ich mir aus einem Altwasser der Isar nahe Baierbrunn im Isartal beschaffen.

*Acanthocyclops vernalis*¹, den ich in der Münchner Umgebung vergeblich suchte, stammt aus kleinen Almtümpeln bei Lunz am See in Niederösterreich.

Macrocyclus fuscus wurde in einer kleinen Wasserlache links der Isar unterhalb von Höllriegelskreuth im Isartal sowie in einem Weiher bei Wessobrunn (Obb.) gefunden.

Eucyclops serrulatus stammte ebenfalls aus den Wasserbecken des Zoologischen Instituts und aus dem Ismaninger Teichgebiet nördlich von München.

Alle genannten Arten ließen sich ohne Schwierigkeiten im Laboratorium züchten; als Futter diente angefaulter Kopfsalat. Die weiblichen Tiere wurden während der Eiablage beobachtet, so daß die Fixierung entweder zu Beginn derselben, wenn noch die meisten Eier in den Ovidukten lagen, oder in beliebigen Abständen danach erfolgen konnte. Die besten Resultate erzielte ich mit einer einstündigen Fixierung in Bouin modifiziert nach Krallinger. Die 10 μ dicken Schnitte wurde nach Feulgen gefärbt. Von den Hoden wurden ausnahmslos in Karminessigsäure angefärbte Quetschpräparate hergestellt. Nach Feulgen gefärbte Hodenschnittpräparate ergaben keine brauchbaren Bilder, da die dichte Lagerung der Chromosomen in den Spermatozyten I und II keine exakten Zahlenangaben erlaubte.

III. Eigene Untersuchungen

1. *Megacyclops viridis* JURINE

Diese Art besitzt in beiden Geschlechtern eine diploide Chromosomenzahl von 12. Ebenso wie BRAUN (1909) fand ich die von HACKER (1902) während der Oogenese beobachteten „Mikrochromosomen“ nicht.

An Hand von Karminessigsäure-Quetschpräparaten wurde der zeitliche Ablauf der Reifeteilungen im Ei festgestellt; es ergab sich jedoch hierbei nichts Neues für die Cyclopiden, so daß nur das Wichtigste erwähnt werden soll: Die Eier kommen während der Prometaphase I zur Ablage, gleichzeitig findet die Besamung statt. Der Spermienkern bleibt während der Reifeteilungen an der Peripherie des Eies liegen; der Eikern wandert während der Eiablage ebenfalls an die Eioberfläche und zwar derart, daß die später nach außen abgegebenen Richtungskörper stets ins Innere des Eisäckchens und nicht zwischen Ei und

¹ Herrn Dr. F. KIEFER und Herrn Professor Dr. V. BREHM möchte ich für die Bestimmung dieses Materials vielmals danken.

Eisäckchenwand zu liegen kommen. Die Chromosomen stellen sich unterdessen in die Metaphasespindel I ein. Bei einer Temperatur von 18° C beginnt etwa 2—3 min nach der Eiablage die Metakinese. Die erste Reifeteilungsspindel ist stark gedrunken und tonnenförmig. Nach einer rasch ablaufenden Anaphase I etwa 10 min nach der Eiablage schnürt sich der erste Richtungskörper ab. Ohne eigentliche Telophase beginnt nach weiteren 5 min die Metaphase II. Die Spindel der Anaphase II (20—25 min nach der Ablage der Eier) ist bedeutend schlanker und höher als die der ersten Reifeteilung. 5—10 min später wird der zweite Richtungskörper ebenfalls nach außen abgestoßen. Die Kernverschmelzung erfolgt etwa 45 min nach Bildung der Eisäckchen.

Kurz bevor die Eier die Ovidukte verlassen, um in die Eisäckchen überzutreten, d. h. kurz vor der Befruchtung, liegen sich in den Eikernen die homologen Chromosomen in der für die Cyclopiden typischen, schon von HÄCKER beschriebenen „biseriellen Anordnung“ gegenüber. Die Homologen nehmen hierbei eine Parallelstellung ein, so daß der Abstand zwischen ihnen jeweils das 1—1,5fache der eigenen Breite beträgt. Wie lange vor der Eiablage diese Stellung von den Chromosomen eingenommen wird, konnte nicht festgestellt werden, da sich an den reifenden Eiern keinerlei Markierung beobachten ließ, die eine genaue Zeitangabe für die spätere Ablage zugelassen hätte. Diese Distanzkonjugationen der beiden Chromosomensätze ist für einen Vergleich der Homologen nach Größe und Form bei *Megacyclops viridis* wie auch den übrigen hier untersuchten Cyclopiden besonders günstig.

Das Weibchen von *M. viridis* besitzt 6 Bivalente (Abb. 1, 2), unter denen sich zu dieser Zeit neben den 5 Autosomenpaaren, die sich in Länge und Breite sehr ähneln, ein oft zentralgelegenes (Abb. 1) Heterochromosomenpaar zu erkennen gibt. Es besteht aus einem kürzeren, ungleichschenkeligen X-Chromosom und dem deutlich längeren, ungleichschenkeligen, oft abgewinkelt erscheinenden Y-Chromosom.

Nachdem sich die Chromosomen bald nach der Eiablage unter weiterer Kontraktion in die Metaphase-I-Spindel eingeordnet haben, tritt der Größenunterschied zwischen X- und Y-Chromosomen kaum noch hervor; und während der ersten Reifeteilung unterscheiden sich die beiden Heterochromosomen in ihrem Verhalten nicht von den 10 Autosomen.

Erst in der Metaphase II zeigt es sich, daß die erste Reifeteilung für die Heterochromosomen die Reduktionsteilung war; in den Eisäckchen befinden sich nunmehr zwei Sorten von Oocyten II: Solche mit Metaphasen, aus denen die männchenbestimmenden Pronuclei hervorgehen, enthalten 6 annähernd gleichgroße Chromosomen und zwar 5 Autosomen und ein X, wobei letzteres zwischen den Autosomen nicht identifizierbar ist (Abb. 3a); die Oocyten II, aus denen die weibchenbestimmenden

Pronuclei hervorgehen, besitzen dagegen 5 Autosomen und das deutlich längere, in einigen Fällen S-förmige, gebogene Y-Chromosom (Abb. 3b).

Das Zahlenverhältnis dieser beiden nach der ersten Reifeteilung im Eisäckchen liegenden Tochterplattensorten konnte experimentell beeinflusst werden. Je nach den Umweltsbedingungen, unter welchen die

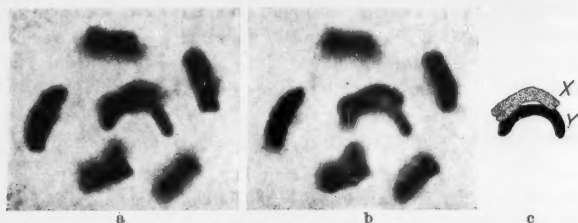


Abb. 1a—c. *Megacyclops viridis*, Prometaphase eines Eies im Ovidukt kurz vor der Eiablage, zentralgelegt das X-Y-Bivalent. a eingestellt auf Y, b auf X, c X-Y herausgezeichnet¹



Abb. 2. *Megacyclops viridis*, Prometaphase eines Eies im Ovidukt kurz vor der Eiablage

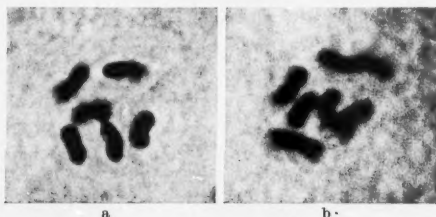


Abb. 3 a u. b. *Megacyclops viridis*, Metaphasen II. a aus einer männchenbestimmenden 2. Oocyte, b aus einer weibchenbestimmenden 2. Oocyte

Eier zur Ablage kamen, ließ es sich zugunsten der männchen- oder der weibchenbestimmenden Chromosomensätze verschieben.

Es wurden 25 reife Weibchen während der Eiablage bei 18° C gehalten und ihre Eisäckchen zur Zeit der Metaphase II, 15 min nach der Eiablage, fixiert. Von den 247 ausgezählten einwandfreien Tochterplatten waren

110 = 44,5% ♂♂ best. und 137 = 55,5% ♀♀ best. (siehe Tabelle 1a).

¹ Alle Abbildungen sind bei 2500facher Vergrößerung reproduziert worden.

Weitere 25 Weibchen legten ihre Eier bei 23°C ab und wurden möglichst kurz — maximal 6 Std — vor der Ablage 5 min lang mit UV-Licht¹ bestrahlt; auch hier wurden die Eisäckchen während der Metaphase II fixiert. Von den 228 ausgezählten einwandfreien Tochterplatten waren 166 = 72,8% ♂♂ best. und 62 = 27,2% ♀♀ best. (siehe Tabelle 1 b).

Tabelle 1. Häufigkeit der Metaphase II-Platten mit X- bzw. Y-Chromosomen

a) bei 18° C			b) bei 23° C und UV-Bestrahlung von 5 min		
Gelege Nr.	Eikern mit X	Eikern mit Y	Gelege Nr.	Eikern mit X	Eikern mit Y
1	10	15	1	15	7
2	3	3	2	13	5
3	5	7	3	6	1
4	1	2	4	4	3
5	2	6	5	9	1
6	11	9	6	8	1
7	3	3	7	6	2
8	2	3	8	8	4
9	6	8	9	2	0
10	2	5	10	2	0
11	5	9	11	8	4
12	1	1	12	2	0
13	7	7	13	13	6
14	6	7	14	3	1
15	4	4	15	3	0
16	6	2	16	4	0
17	7	9	17	2	0
18	2	5	18	5	11
19	3	3	19	8	4
20	2	1	20	8	0
21	8	8	21	4	0
22	2	2	22	21	8
23	6	6	23	4	0
24	3	8	24	2	1
25	3	4	25	6	3
Gesamt	110	137		166	62
%	44,5	55,5		72,8	27,2

Die Anzahl der Eier in den Eisäckchen beträgt pro Weibchen durchschnittlich 50; 25 Weibchen legen insgesamt etwa 1250 Eier ab. Da jedoch, wie nebenstehende Tabelle zeigt, im ungünstigsten Fall nur 2 — maximal 29 — einwandfreie Tochterplatten pro Gelege ausgezählt werden konnten, war es notwendig, zu prüfen, inwieweit der Prozentsatz der Weibchen bzw. Männchen dieser Stichproben von 247 (Tabelle 1a) und 228 (Tabelle 1b) mit dem wahren Prozentsatz der Weibchen bzw. Männchen eines dieser Stichproben zugrunde liegenden Kollektivs übereinstimmt. Da eine genaue Bestimmung der gesuchten wahren Werte nicht möglich ist, wurden für die einzelnen Fälle jeweils 2 Mutungsbereiche angegeben, innerhalb derer diese beobachteten Werte mit einer Wahrscheinlichkeit von 95,5 bzw. 99,7% in der Grundgesamtheit liegen.

Durch Außenfaktoren ließ sich also das Verhalten der Heterochromosomen in der reduktionellen I. Reifeteilung beeinflussen. Bei einer

¹ Für die UV-Bestrahlung wurde eine Osram-Ultravitaluxlampe benutzt mit einer Gesamtbestrahlungsstärke von 4% für UV, 9% für den sichtbaren Bereich und 87% für UR. Die Lampe stand senkrecht über den zu bestrahlenden Tieren, der Abstand Lampenkuppe — Objekt betrug 26,5 cm, wobei ich mich nach der Versuchsanordnung von METZLER (1957) richtete.

Temperatur von 18°C gelangten nur wenig mehr Y als X in die Oocyten II, so daß ein primäres Geschlechtsverhältnis von etwa 1:1 zustande kam. Bei einer Temperatur von 23°C und gleichzeitiger UV-Bestrahlung dagegen wurde in $\frac{3}{4}$ aller Fälle das Y-Chromosom in den ersten Richtungskörper abgegeben. Nach Aufzucht der Nachkommen der so behandelten

Weibchen mußte bei 18° ein schwaches Überwiegen der Weibchen, bei 23° und UV dagegen ein starker Männchenüberschuß zu beobachten sein. Daß dies tatsächlich der Fall ist, zeigen die Versuche von METZLER (1957); sie ließ

Tabelle 2. Beobachtete Prozentwerte der ♀♀ und die zugehörigen Mutungsbereiche¹

Versuch bei		18° C	23° C und UV
Beobachtet		55,5%	27,2%
Mutungsbereich	P=0,955	49,1—61,7	21,9—33,5
	P=0,997	46,0—64,7	19,3—36,9

¹ Nach den Tabellen für Mutungsgrenzen von H. v. SCHELLING.

unter denselben Bedingungen *M. viridis* zur Eiablage kommen und erhielt in der Tochtergeneration ein Geschlechtsverhältnis von

46,2% ♂♂ : 53,8% ♀♀ bei 18° C

84,7% ♂♂ : 15,3% ♀♀ bei 23° C und 5 min UV-Bestrahlung.

Mit diesen Daten stimmen die cytologischen Ergebnisse überein, die Geschlechtsbestimmung von *M. viridis* beruht also auf einer gerichteten Verteilung der X- und Y-Chromosomen.



Abb. 4 a u. b. *Megacyclops viridis*, Metaphasen I aus zwei Spermatocyten

In der Spermatogenese sind gut übersehbare Reifeteilungsstadien, die denen der weiblichen Meiose in ihrer Klarheit gleichen, außerordentlich selten. Einwandfreie Metaphaseplatten I zeigen 6 annähernd gleichgroße Bivalente, unter denen das X-Y-Bivalent nicht zu identifizieren ist (Abb. 4).

Da die Oogenese von *M. viridis* schon wiederholt untersucht worden ist (HÄCKER 1902, BRAUN 1909, MATSCHECK 1910, HEBERER 1924, STELLA 1931) und man bisher keinerlei Anzeichen eines Heterochromosomenpaares gefunden hatte, lag die Frage nahe, ob ein Chromo-

somendimorphismus innerhalb der gleichen Art vorliegt und ob die hier beschriebene Heteromorphie von X und Y auf die hiesige Gegend beschränkt sei. Es wurde deshalb *M. viridis* aus Bonn und der Umgebung von Krefeld cytologisch untersucht; dabei stellte es sich heraus, daß die in Westdeutschland vorkommenden Individuen auch in bezug auf ihre chromosomale Beschaffenheit der Münchner Population

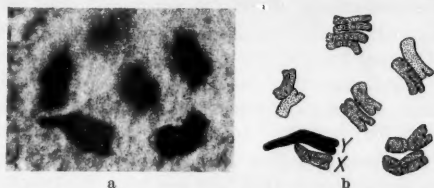


Abb. 5a u. b. *Megacyclops viridis*, Prometaphase eines Eies im Ovidukt kurz vor der Ablage. Photo und Zeichnung

gleichen (Abb. 5). Auch sie besitzen im weiblichen Geschlecht neben den 5 Autosomenpaaren ein ungleiches Paar von Heterochromosomen. *Megacyclops viridis* mit einem Chromosomensatz von $10+XY$ scheint daher weitverbreitet zu sein. Das Vorkommen andersartiger Lokalformen in verschiedenen Gegenden wird damit allerdings nicht ausgeschlossen.

2. *Acanthocyclops robustus* Sars

Diese Art, welche dem weiter unten aufgeführten *Acanthocyclops vernalis* sehr ähnlich ist und von manchen Autoren nur als eine Varietät oder Form von diesem angesehen wird, wurde hier zum ersten Male cytologisch untersucht. Im Gegensatz zu *A. vernalis* besitzt er in beiden Geschlechtern im diploiden Satz 6 Chromosomen. Diese geringe Chromosomenzahl war bisher unter den Cyclopiden nur von *Metacyclops gracilis* bekannt.

Kurz vor der Eiablage, während der Distanzpaarung der Homologen in den Eikernen, sind die Chromosomen wie die von *Megacyclops viridis* stäbchenförmig jedoch weit aus schlanker als jene (Abb. 6). Unter den 3 Homologenpaaren lassen sich keine morphologisch differenzierten Geschlechtschromosomen erkennen; die jeweiligen Partner des einen längeren und der beiden kürzeren Bivalenten scheinen völlig identisch.



Abb. 6a u. b. *Acanthocyclops robustus*, Prometaphase eines Eies im Ovidukt kurz vor der Ablage. Photo und Zeichnung

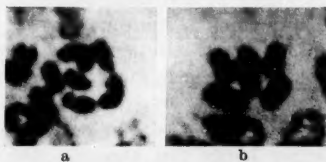


Abb. 7a u. b. *Acanthocyclops robustus*, Metaphasen I aus zwei Spermatocyten

Art und zeitlicher Ablauf der Reifeteilungen gleichen vollkommen denen von *M. viridis*. Während der Eiablage behalten die Homologen ihre Parallelstellung in den Eikernen bei und ordnen sich etwa 2 min später unter stärkeren Kontraktionen in die Metaphase-I-Spindeln ein. Weder in der folgenden Anaphase I, etwa 8 min nach der Ablage, noch während der Anaphase II (20 min nach Bildung der Eisäckchen) gibt sich ein Chromosomenpaar durch ein gegenüber den Autosomen abweichendes Verhalten als Geschlechtschromosomenpaar zu erkennen.

Bei den Untersuchungen der Spermatogenese wurde niemals das Stadium der Parallellagerung der Homologen während der Prometaphase I gefunden. Es ist jedoch möglich, daß durch die Quetschtechnik die beiden Chromosomensätze auseinandergepreßt wurden. Aus einwandfreien Metaphase-I-Platten ließen sich die Homologen zu Bivalenten ordnen, wobei jedoch auch hier wie beim Weibchen kein Heterochromosomenpaar erkennbar war (Abb. 7).

3. *Acanthocyclops vernalis* FISCHER

Die diploide Chromosomenzahl von *A. vernalis* beträgt in beiden Geschlechtern 10. Die Prometaphasechromosomen des Weibchens sind

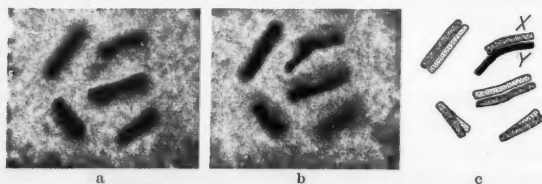


Abb. 8a—c. *Acanthocyclops vernalis*, Prometaphase eines Eies im Ovidukt kurz vor der Ablage. a, b Platte in zwei Einstellungen, c Zeichnung

ebenfalls stäbchenförmig, jedoch auch hier sehr viel schlanker als die von *Megacyclops viridis*. Während der Distanzkonjugation der Chromosomen in den ablagebereiten Eiern der Ovidukte sind unter den 5 Bivalenten 4 Autosomenpaare, deren Homologen einander völlig gleichen, und 1 Heterochromosomenpaar zu finden (Abb. 8). Letzteres besteht aus einem kürzeren X- und dem merklich längeren, oft abgewinkelten Y-Chromosom. Von den 4 Autosomenpaaren sind zwei deutlich länger als die beiden anderen, wobei das X-Chromosom in seiner Länge den kürzeren, das Y-Chromosom den beiden längeren Bivalenten gleicht.

Nach der ersten Reifeteilung, während der entweder das Y- oder das X-Chromosom in den ersten Richtungskörper abgewandert ist, befinden sich in den Eisäckchen wiederum zwei Sorten von weiblichen

Chromosomenbeständen, die auch hier besonders gut zur Zeit der Metaphase II (etwa 13 min nach Eiablage) miteinander verglichen werden können. Die weibchenbestimmenden Platten (Abb. 9a) besitzen: 3 längere + 2 kürzere Chromosomen, d. h.

$2A + Y' + 2A$.

Die männchenbestimmenden Chromosomenbestände (Abb. 9b) enthalten:

2 längere + 3 kürzere Chromosomen, d. h.

$2A + 2A + X$.

Die Oogenese von *Acanthocyclops vernalis* wurde ebenfalls schon von BRAUN und von MATSCHKÉ untersucht; BRAUN berichtet auch in diesem Fall nichts von einem inäqualen Chromosomenpaar; er stellte jedoch gleichfalls 5 Bivalente fest, „wobei eine der 5 Ditetraden sich durch besondere Größe auszeichnete“. Allerdings untersuchte BRAUN den Chromosomenbestand von *A. vernalis* kurz nach der Eiablage, d. h. während der Metaphase I, zu einer Zeit, wo ein Längenunterschied zwischen den Geschlechtschromosomen nur noch sehr schwer zu erkennen ist. MATSCHKÉ dagegen fand in einem Material aus Württemberg Individuen mit $2n = 10$ und solche mit $2n = 10 + 2$ Mikrochromosomen. Leider gibt MATSCHKÉ nicht an, ob beide Formen nebeneinander oder an getrennten Orten vorkamen.

In der Spermatogenese lassen sich zwischen den Homologen der 5 Bivalente keinerlei Unterschiede finden. Während der Metaphase I liegen in den Spermatocyten I. Ordnung 2 längere und 3 kürzere Chromosomenpaare (Abb. 10); zu den letzteren gehört das X-Chromosomenpaar.

4. *Macrocyclops fuscus* JURINE

Die diploide Chromosomenzahl von *M. fuscus* beträgt sowohl im weiblichen als auch im männlichen Geschlecht 14. Sämtliche Elemente sind mediokinetisch (Abb. 11b). Die 7 Ditetraden sind entweder kreisförmig angeordnet (Abb. 11a), oder 6 Bivalente liegen um ein

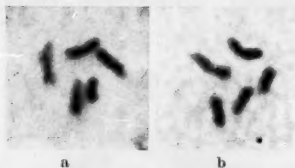


Abb. 9a u. b. *Acanthocyclops vernalis*, Metaphasen II. a aus einer weibchenbestimmenden 2. Oocyte. b aus einer männchenbestimmenden 2. Oocyte



Abb. 10a—d. *Acanthocyclops vernalis*, Metaphase I von zwei Spermatocyten. a, b Photo und Zeichnung von einer, c, d dasselbe von einer anderen Zelle

zentrales 7. Bivalent. Zwischen den Homologen eines jeden Chromosomenpaares ist zu dieser Zeit kein Unterschied zu erkennen.

Auch in der Spermatogenese konnte unter den 14 Chromosomen kein strukturell differenziertes Geschlechtschromosomenpaar festgestellt

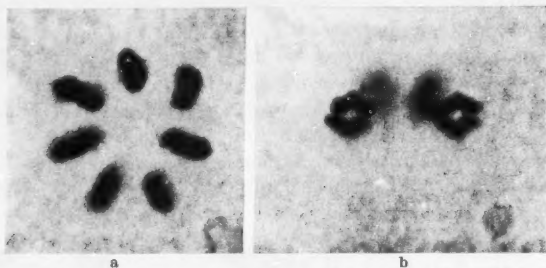


Abb. 11a u. b. *Macrocylops fuscus*, Prometaphase zweier Eier im Ovidukt kurz vor der Ablage. a Polansicht, b Seitenansicht

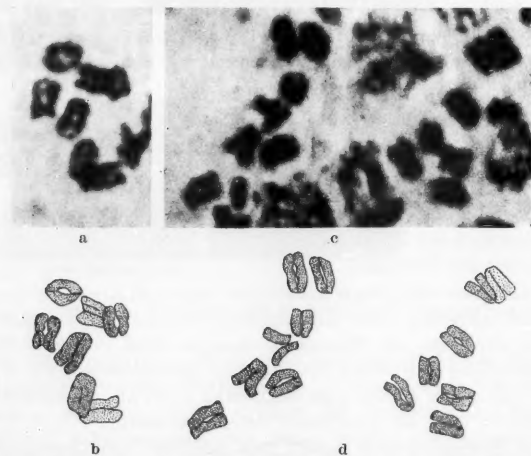


Abb. 12a—d. *Macrocylops fuscus*, Metaphase I von drei Spermatocyten. a, b Photo und Zeichnung von einer Zelle, c, d dasselbe von 2 anderen Zellen

werden. Während der Metaphase I der Spermatocyten entsprachen sich die homologen Partner der 7 Bivalente, soweit die nicht sehr günstigen cytologischen Verhältnisse diese Aussage zulassen, völlig (Abb. 12).

5. *Eucyclops serrulatus* FISCHER

E. serrulatus weist im weiblichen Geschlecht $2n = 13$ Chromosomen auf, ist also heterogametisch. Während der Distanzpaarung der Chromosomen in den Eikernen kurz vor der Eiablage findet sich neben den

6 Bivalenten stets ein kleineres unpaares Element (Abb. 13). Zu dieser Zeit ähneln die Chromosomen in ihrer Gestalt sehr denen von *Macrocylops fuscus*. Auch sie erscheinen gedrunken und hantelförmig und die Homologen eines jeden Bivalents liegen einander zugekrümmt.

Während der ersten Reifeteilung wird das univalente X reduktionell verteilt. Die haploiden Chromosomensätze sind auch in diesem Falle während der Metaphase II etwa 15 min nach der Eiablage gut miteinander zu vergleichen. In den Eisäckchen befinden sich nun die weibchenbestimmenden Oocyten II mit nur 6 Autosomen (Abb. 14a, b) und die männchenbestimmenden mit 6 Autosomen und

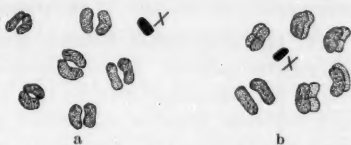


Abb. 13a u. b. *Eucyclops serrulatus*, Prometaphasen I von zwei Oocyten kurz vor der Ablage



Abb. 14a—e. *Eucyclops serrulatus*, Metaphasen II. 'a, b aus einer weibchenbestimmenden 2. Oocyte. c—e aus einer männchenbestimmenden 2. Oocyte. c, d dieselbe Platte in zwei Einstellungen. b, e Zeichnungen zu den Photos a, bzw. c, d

dem kleineren X-Chromosom, das in seiner Größe dem Univalent der Metaphase entspricht (Abb. 14c—e).

Die Untersuchung der Spermatogenese und eine Auszählung der Chromosomen in der Metaphase I ergab stets eine Diploidzahl von 14 (Abb. 15). In einigen Fällen war unter ihnen ein kleineres Chromosomenpaar zu erkennen, welches als das X-Chromosomenpaar angesehen wurde. Die haploiden Spermatocyten II besaßen stets 7 Chromosomen.

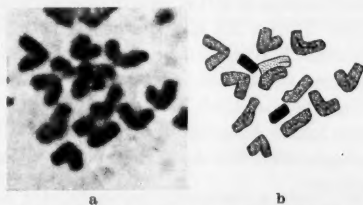


Abb. 15a u. b. *Eucyclops serrulatus*, Metaphase I einer Spermatocyte. a Photo, b Zeichnung

Schon BRAUN befaßte sich mit der Cytologie der Oogenese von *Eucyclops serrulatus*, wobei er $2n = 12 + 2$ Mikrochromosomen angab. Seinen Angaben nach zu schließen wurden diese „Mikrochromosomen“, die noch in der Prophase der Meiose ein Univalent bildeten, in der zweiten Reifeteilung

reduktionell verteilt. Bei den von mir untersuchten Individuen dagegen bedeutete für das X-Chromosom stets die erste Reifeteilung die Reduktionsteilung.

IV. Diskussion

Die hier mitgeteilten Befunde umfassen 3 Fälle struktureller weiblicher Heterogametie. Zu dem einzigen sicheren Fall eines X-O-Mechanismus bei *Ectocyclops strenzkei* ($2n \text{ ♀} = 11$) (BEERMANN 1954) und den nach früheren Angaben vermutlich gleichen Fällen bei *Macrocylops distinctus* ($2n \text{ ♀} = 11$), *Eucyclops prasinus* ($2n \text{ ♀} = 13$), *Paracyclops affinis* ($2n \text{ ♀} = 13$) und *Ectocyclops phaleratus* ($2n \text{ ♀} = 13$) (vgl. BRAUN) ist *Eucyclops serrulatus* hinzugekommen. Diese Arten gehören sämtlich zur Unterfamilie der *Eucyclopinae*.

In der Unterfamilie der *Cyclopinae* dagegen wurden bei *Megacyclops viridis* und *Acanthocyclops vernalis* die ersten Fälle eines Geschlechtschromosomenmechanismus festgestellt und diese sind vom X-Y-Typus bei ebenfalls weiblicher Heterogametie.

Es könnte der Einwand erhoben werden, daß es sich bei den beschriebenen X-Y-Fällen um eine Heteromorphie eines autosomalen Chromosomenpaares handelt in der Art, wie sie von S. BEERMANN (1959) bei *Cyclops strenuus* festgestellt ist, die auf Unterschieden im Heterochromatinbesitz sonst homologer Chromosomen besteht und während der Diminutionsteilung durch Abstoßen des Diminutionschromatins verlorengeht. Doch hat S. BEERMANN für *M. viridis* ausdrücklich das Fehlen von Diminutionserscheinungen angegeben. Außerdem wäre es nicht ohne weiteres verständlich, daß sich die Heteromorphie nur auf ein Chromosomenpaar beschränkt und daß dieses nur im weiblichen Geschlecht auftritt. Schließlich ist die Parallele zwischen den hier berichteten Ergebnissen an *M. viridis* über die Verschiebung der Häufigkeit der Oocyten II mit längerem und kürzerem heteromorphen Chromosomen (also Y und X) und denen von METZLER über die Verschiebung des Geschlechtsverhältnisses unter veränderten Außenbedingungen nicht anders zu deuten, als daß das heteromorphe Chromosomenpaar der Weibchen wirklich X und Y darstellt. Daß es sich schließlich nicht um eine lokale Ausprägungsweise des X-Y-Paares handelt, zeigen die gleichartigen Befunde an Material aus zwei weit auseinanderliegenden Gegenden.

Neben Arten mit einem cytologisch erkennbaren Geschlechtschromosomenmechanismus, der also als X-O-Typus für die Eucyclopinen, als X-Y-Typus für die Cyclopinen nachgewiesen ist, finden sich in beiden Unterfamilien auch Arten, bei denen sich mikroskopisch kein strukturverschiedenes Chromosomenpaar feststellen läßt; von den hier beschriebenen Arten sind das unter den Eucyclopinen *Macrocylops fuscus* und

unter den Cyclopinen *Acanthocyclops robustus*. Nach früheren Angaben von BRAUN und MATSCHKÉ können auch noch weitere Arten beider Subfamilien in diese Gruppe gestellt werden. Die Differenzierungshöhe der Geschlechtschromosomenmechanismen ist also bei den Copepoden noch nicht sehr weit fortgeschritten. Es ist nicht einmal sicher, daß bei den Arten ohne erkennbare Geschlechtschromosomen immer genotypische Geschlechtsbestimmung vorliegt und so ein physiologisches Geschlechtschromosomenpaar vorhanden ist. Denn nach den Arbeiten von TAKEDA und von EGAMI an *Tigriopus japonicus* scheint die Möglichkeit zu bestehen, daß bei manchen Arten auch nur modifikatorische Geschlechtsbestimmung erfolgt. Zur Klärung dieser Frage sind weitere Untersuchungen an Vertretern der verschiedenen systematischen Gruppen der Copepoden notwendig.

Zusammenfassung

1. Die genotypische Geschlechtsbestimmung von *Megacyclops viridis* JURINE ist gekennzeichnet durch weibliche Heterogametrie vom X-Y-Typ. Das Weibchen besitzt $2n = 10 + XY$, das Männchen $2n = 10 + XX$. Es gelang eine experimentelle Beeinflussung der geschlechtsbestimmenden Reifeteilung.

2. *Acanthocyclops robustus* SARS hat in beiden Geschlechtern eine diploide Chromosomenzahl von 6 ohne strukturell differenzierte Geschlechtschromosomen.

3. *Acanthocyclops vernalis* FISCHER ist im Weibchen digametisch mit $2n = 8 + XY$; das Männchen besitzt $2n = 8$ Autosomen und 2 X-Chromosomen.

4. Die Diploidzahl der Chromosomen von *Macrocyclus fuscus* JURINE beträgt in beiden Geschlechtern 14 ohne cytologisch unterscheidbare Geschlechtschromosomen.

5. *Eucyclops serrulatus* FISCHER ist im weiblichen Geschlecht heterogametisch mit $2n = 12 + 1$ X-Chromosom, das Männchen besitzt $2n = 12 + XX$ -Chromosomen.

Literatur

- AMMA, K.: Über die Differenzierung der Keimbahnzellen bei den Copepoden. Arch. Zellforsch. **6**, 497—576 (1911).
BEERMANN, S.: Chromatin-Diminution bei Copepoden. Chromosoma (Berl.) **10**, 504—514 (1959).
BEERMANN, W.: Weibliche Heterogametrie bei Copepoden. Chromosoma (Berl.) **6**, 381—390 (1954).
BRAUN, H.: Die spezifischen Chromosomenzahlen der einheimischen Arten der Gattung *Cyclops*. Arch. Zellforsch. **3**, 449—482 (1909).
EGAMI, N.: A note of the sex-differentiation of the marine copepod *Tigriopus japonicus*. Annot. zool. jap. **24**, 131—136 (1951).

- HÄCKER, V.: Über das Schicksal der elterlichen und großelterlichen Kernanteile. Jena. Z. Naturwiss. **37**, 297—398 (1902).
- HEBERER, B.: Die Spermatogenese der Copepoden. I. u. II. Z. Zool. **123**, 555—642 (1924); **142**, 191—253 (1932).
- MATSCHEK, H.: Über Eireife und Eiablage bei Copepoden. Arch. Zellforsch. **5**, 37—111 (1910).
- METZLER, S.: Über die Beeinflussbarkeit des Geschlechtsverhältnisses von *Cyclops viridis* JUR. durch Außenfaktoren. Zool. Jb., Abt. allg. Zool. u. Physiol. **67**, 81—116 (1957).
- STELLA, E.: Die Cytologie der Geschlechtszellen einiger Cyclopiden mit Bezug auf ihre systematische Stellung. Intern. Rev. Hydrobiol. **26**, 112—142 (1931).
- TAKEDA, N.: Experimental studies on the effect of external agencies on the sexuality of a marine copepod. Physiol. Zool. **23**, 288—301 (1950).

Dr. MARIA ELISABETH RÜSCH,
Großhesselohe b. München, Pullacher Str. 12

From the Department of Botany, University College of Ghana
CHIASMA FREQUENCY IN THE TWO SEX MOTHER-CELLS
OF A HERMAPHRODITE

By

J. YANNEY WILSON

With 1 Figure in the Text

(Received July 7, 1960)

A. Introduction

In genetical studies comparison of the frequency of crossing-over in both the male and female mother-cells has been made in only a few organisms. These studies include the works of NABOURS (1919) on the grouse locust, DUNN (1920) on the rat, EMERSON and HUTCHINSON (1921), EYSTER (1922) and STADLER (1926) on maize, and BATESON (1921) and DE WINTON and HALDANE (1935) on *Primula*. The results of these works appear contradictory, and this is probably due to the nature of the different mutant genes under study.

In the cytological sphere, as FOGWILL (1958) remarked, there has also been considerable neglect of studies on chiasma frequency in the female mother cells since the handling presents considerable difficulties compared with that of the male mother cells. Here again the scanty literature shows that in some organisms the chiasma frequency is higher in the female than in the male mother cells, as found by CREW and KOLLER (1932) in the house mouse, BRYDEN (1933) in the Wistar rat, and PASTOR and CALLAN (1952) in the hermaphrodite worm *Dendrocoelum*. In other organisms it has not been possible to detect any significant differences, as shown by the studies of DARLINGTON and LA COUR (1940) on *Lilium testaceum* and BROCK (1954) on *Lilium* species and hybrids.

Before proper evaluation could be made of these results one possible source of error would have to be considered in future works. This is the fact that in some organisms meiosis in the two sex mother cells takes place at different times and therefore under different weather conditions. This would destroy the basis for a fair comparison particularly in surface plants. The ideal condition for making a genuine comparison is fulfilled in some hermaphrodite organisms in which meiosis could be studied almost at the same time and under the same conditions in the two sex mother cells of one and the same organism. This will eliminate both genotypic heterogeneity and environmental effects (WILSON 1959a). In this respect the recent work of FOGWILL (1958) on *Lilium* and *Fritillaria* is particularly appropriate, and more of such data are badly needed.

The present work was carried out a few years ago in a manner similar to that of FOGWILL. The Bluebell, *Endymion nonscriptus* was chosen owing to its suitability for such cytological studies. The general features of gametogenesis in this species had been studied by HOARE (1934). Unlike other plants like *Lilium*, *Fritillaria* and *Tulipa* in which meiosis in the embryo-sac occurs long after that in the anther and often coincides with pollen mitosis I (SARGANT 1896; DARLINGTON and LA COUR 1947), that in the Bluebell follows just after tetrad-formation in the anthers of the same bud. In fact, present studies have shown that leptotene begins at the same period in the two sex mother-cells of the same bud, that the pachytene stage is held up in the embryo-sac until tetrads have formed in the anthers of the same bud as well as in the next two buds that follow. In other words meiosis in the two sex mother cells goes on in the same plant at the same time.

B. Material and methods

The bulbs of the Bluebell, *Endymion nonscriptus* (L). GARCKE, used for the present work came from Madingley Wood, Cambridge, and were collected for examination when meiosis was going on in the field.

The method of handling has already been described (WILSON 1959b), the essential features of which being the use of petri-dishes instead of pots, and absorbent cottonwool in place of soil. Chiasma frequency was determined in the same plant at the same time at 5° C but in different flower-buds.

Anther squashes were made after fixing the inflorescence in 1:3 acetic-alcohol. The anthers were stained by the Feulgen method.

For embryo-sac squashes the method used was essentially that described by HAQUE (1954) except that a slight modification had to be made here to suit the present material. Since, as mentioned above, meiosis in the embryo-sac in this species went on in the same inflorescence during meiosis in the pollen mother-cells, the ovaries were found to be too small to allow handling by slitting into strips. Therefore, the ovaries were removed and, after a few incisions had been made in them, they were fixed as a whole. After staining, the ovary wall was carefully removed under a dissecting microscope and the ovules released. Slides were made permanent in the usual way.

C. Observations

A total of 40 plants were examined for meiosis in the embryo-sac mother-cells and in the pollen mother-cells. In the embryo-sac mother-cell, meiosis was as normal as in the pollen mother-cell with practically no chromosome aberrations. There was, however, some difficulty in getting many embryo-sac mother-cells at diakinesis or metaphase, and adequate data were obtained from only nine plants in each of which chiasma frequency could be scored in about ten cells at diakinesis or metaphase. The mean based on these counts was compared with that of about twenty pollen mother-cells for each plant.

The full data on the nine plants are given in Table 1. The mean chiasma frequencies of the two sex mother-cells were compared by the *t*-test, and the results are tabulated in Table 2. The data show that in 6 out of the 9 plants the chiasma frequency was higher in the embryo-sac than in the pollen mother-cell, although it was only in two of these that

Table 1. *Chiasma frequencies in embryo-sac and pollen mother cells per plant in E. nonscriptus*

Plant No.	No. of EMC or PMC with total Xta or											Total Xta	No. of cells	Mean
	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23				
1. K, 18. 1. 56 (1)														
EMC	—	—	—	3	1	2	—	3	2	2	260	13	20.00	
PMC	—	2	7	5	4	2	—	—	—	—	337	20	16.85	
2. 2. 3. 56 (1)														
EMC	—	2	3	1	2	1	—	—	—	—	150	9	16.67	
PMC	1	3	1	6	5	3	—	1	—	—	345	20	17.25	
3. 2. 3. 56 (2)														
EMC	—	—	—	3	2	2	1	2	1	—	209	11	19.00	
PMC	—	—	3	4	5	4	2	2	—	—	364	20	18.20	
4. 2. 3. 56 (3)														
EMC	—	—	2	2	3	1	2	—	—	—	179	10	17.90	
PMC	—	2	4	3	3	4	3	1	—	—	356	20	17.80	
5. 2. 3. 56 (4)														
EMC	—	—	—	1	2	2	3	2	—	—	193	10	19.30	
PMC	—	—	1	2	5	7	5	—	—	—	373	20	18.65	
6. 16. 3. 56 (1)														
EMC	—	2	4	3	1	—	—	—	—	—	163	10	16.30	
PMC	1	3	4	6	3	2	1	—	—	—	337	20	16.85	
7. 17. 3. 56 (1)														
EMC	—	—	1	2	1	3	1	—	—	—	145	8	18.13	
PMC	—	—	—	5	3	2	3	4	3	—	387	20	19.35	
8.R (1)														
EMC	—	1	1	1	3	—	1	—	—	—	182	10	18.20	
PMC	—	3	5	4	2	3	1	1	1	—	334	20	16.70	
9. R (2)														
EMC	2	—	1	3	2	1	3	—	—	—	182	10	18.20	
PMC	—	3	4	3	4	4	2	—	—	—	348	20	17.40	

the difference reached statistical significance at 5% level — these are R(1) and 2. 3. 56 (4). In the case of the three plants in which the values were higher in the pollen mother-cells, the differences were not significant, and in one of them [2. 3. 56(3)] the difference was in fact negligible.

One aspect of these results worth studying was the relationship between the values per plant. This was to see whether there was any significant correlation between the chiasma frequency of the two sex

cells. The mean values given in Table 2 were used in calculating the correlation coefficient (r) which was $+0.24$ (see also Fig. 1). With 7 degrees of freedom this was not significant at the 5% level. This seems to be contrary to expectation.

Table 2. Comparison of mean chiasma frequencies of embryo-sac and pollen mother-cells in plants of *E. nonscriptus*

Plant No.	Mean CF of EMC	Mean CF of PMC	Diff.	<i>t</i>	<i>P</i>
1. 18. 1. 56 (1)	20.00	16.85	+ 3.15	5.233	> 0.001
2. 2. 3. 56 (2)	16.67	17.25	- 0.58	0.928	0.4-0.3
3. 2. 3. 56 (2)	19.00	18.20	+ 0.80	1.307	0.2
4. 2. 3. 56 (3)	17.90	17.80	+ 0.10	0.153	0.9
5. 2. 3. 56 (4)	19.30	18.65	+ 0.65	1.395	0.2
6. 16. 3. 56 (1)	16.36	16.85	- 0.55	1.036	0.3
7. 17. 3. 56 (1)	18.13	19.35	- 1.22	1.773	0.1
8. R (1)	18.20	16.70	- 1.50	2.052	0.05
9. R (2)	18.20	17.40	+ 0.80	1.303	0.2

D. Discussion

(i) In spite of the apparent overall absence of significant differences between the values of chiasma frequency of the male and female mother-cells in the Bluebell it is worth noting that in six out of the nine plants, chiasma frequency was in fact higher in the embryo-sac than in the pollen mother-cell, and that in the three cases where the reverse was the case, the differences were quite negligible compared with those in which higher values were found in the embryo-sac. It is also worth noting that from even the scanty literature cited in the introduction, in no case has it been found that the chiasma frequency was clearly higher in the pollen mother-cell. So it looks as if in the hermaphroditic organisms specially studied in this respect the tendency is clearly to have (i) a higher chiasma frequency in the female mother-cell, as in *Dendrocoelum* (PASTOR and CALLAN 1952), *Lilium* and *Fritillaria* (FOGWILL 1958), (ii) a slightly higher value again in the female, as in the present observations on *Endymion nonscriptus*, or (iii) probably virtually the same value in the two mother-cells as in *Lilium testaceum* (DARLINGTON and LA COUR 1940) and some *Lilium* hybrids (BROCK 1954). Thus a case in which the mean value is greater in the male mother-cell is yet unknown. The tendency for higher values of chiasma frequency in the female mother-cell may have some relationship with the delay in the pachytene stage which has been demonstrated in the present material and in *Lilium martagon* (SARGANT 1896). Such a delay could result in a longer time for pairing and chiasma formation.

(ii) On the question of expected significant correlation between the values of chiasma frequency in the two sex mother-cells of the same

organism, reference has been made to the two other works with adequate data on the topic (PASTOR and CALLAN 1952 and FOGWILL 1958). PASTOR and CALLAN calculated the correlation coefficient (r) from their data on the six individuals of *Dendrocoelum* as $+0.94$ which was highly significant even at 1% level (see also Fig. 1). The results of FOGWILL have been analysed here to give comparable data. It should be remarked that the

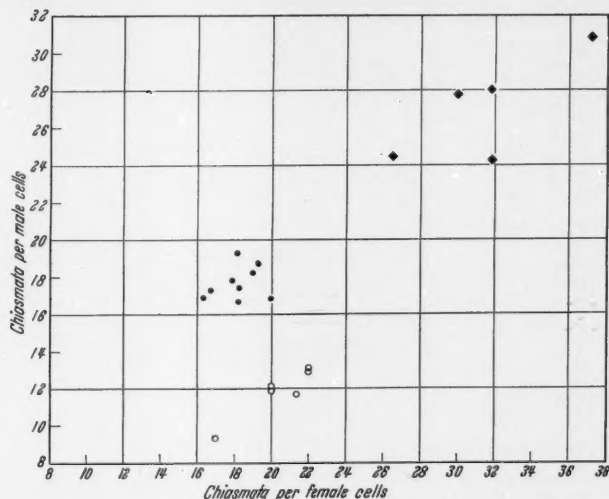


Fig. 1. Graphical representation of the data on the relationship between the chiasma frequency of the two sex mother-cells ● in 9 individuals of the Bluebell, *Endymion nancryptus* (present data), ○ in 6 individuals of *Dendrocoelum* (data from PASTOR and CALLAN 1952), ◆ in 5 individuals of *Lilium longiflorum* (data from FOGWILL 1958)

fact that FOGWILL placed individual plants at different temperatures should not affect the basis of the present analysis unless we assume a heterogeneity in the reaction of temperature on the two sex mother-cells in different individuals. We have no grounds for entertaining this assumption. An analysis of the data on the five individuals of *Lilium longiflorum* in which values were obtained for both sex mother-cells gave a correlation co-efficient (r) of $+0.79$ which is not significant at the 5% level (see also Fig. 1). The number of individuals used for each of the other species was not enough for calculation of correlation co-efficient in each case.

(iii) Another aspect of these studies worth considering is the magnitude of the differences between the chiasma frequencies in the two sex-cells and its bearing on the interpretation of result. Table 3 shows a

Table 3. Data showing a comparison of the size of mean chiasma frequencies in the two sex-cells of different organisms as well as the size of differences between the values in the two sex-cells in the different organisms

	Female (F)	Male (M)	Differences	Ratio F/M
1. PASTOR and CALLAN 1952				
a) <i>Dendrocoelum lacteum</i> (6 individuals)				
Range	17.0—22.0	9.3—13.0	7.7—9.7	1.65—1.83
Overall Mean . .	20.40	11.82	8.58	1.73
2. FOGWILL 1958				
b) <i>Lilium longiflorum</i> (5 individuals)				
Range	26.5—37.2	24.2—31.8	2.0—5.4	1.08—1.32
Overall Mean . .	31.48	27.26	4.22	1.15
c) <i>Lilium martagon</i> (2 individuals)				
Range	40.0—42.0	36.0—36.5	4.0—5.5	1.11—1.15
Overall Mean . .	41.0	36.3	4.7	1.13
d) <i>Fritillaria meleagris</i> (3 individuals)				
Range	30.0—42.5	23.3—26.2	6.7—16.3	1.29—1.65
Overall Mean . .	37.8	24.8	13.0	1.52
e) <i>Lilium</i> species (4 individuals)				
Range	36.0—44.4	31.2—41.2	3.2—10.8	1.08—1.35
Overall Mean . .	41.4	35.2	6.2	1.18
f) <i>Lilium</i> hybrids (4 individuals)				
Range	34.0—41.3	24.8—30.9	3.5—12.3	1.11—1.42
Overall Mean . .	36.1	28.4	7.7	1.27
3. WILSON (Present work)				
g) <i>Endymion nonscriptus</i> (9 individuals)				
Range	16.36—20.00	16.70—19.35	-1.22±3.15	0.97—1.19
Overall Mean . .	18.20	17.67	0.53	1.03

comparison of the chiasma frequencies in the two sex-cells of different organisms critically studied so far, as well as the differences between the values in the two sex-cells in different organisms. From this table it can be seen that the actual values of chiasma frequencies are highest in the *Lilium* species and hybrids, followed by *Fritillaria* and *Dendrocoelum* while *Endymion nonscriptus* has the lowest mean value. When we come to the amount of the differences between the values in the two sex-cells in the different organisms we find that in *Dendrocoelum* the differences are very great and are such that the values in the oocytes ranged from 1.65 to 1.83 times as much as the values in the spermatocytes. The next

organism is *Fritillaria meleagris* with the values in the female gametophyte being about 1.52 times that in the male. In the *Lilium* species and hybrids the ratios are much lower ranging between 1.13 and 1.27. Finally, in *Endymion nanscriptus* the differences are still smaller giving an average ratio of the female to the male of only 1.03.

Now there seems to be some relationship between the significance of the calculated correlation coefficients of the values for the two sex-cells of the three organisms *Dendrocoelum*, *Lilium longiflorum* and *Endymion nanscriptus* and the size of differences between the two sex-cells. In *Dendrocoelum* where the size of the differences between the values in the two sex-cells was greatest a highly significant positive correlation (0.94) was found between the values of the two sex-cells in the same organisms. In *Lilium longiflorum* where the size of the differences was not so great, no significant correlation could be found ($r = 0.79$, 5% pt. = 0.878, 10% pt. = 0.805 with 3 D. F.), and the value was just at the 10% level of significance. But in *Endymion nanscriptus* where the least values of differences were found, the correlation co-efficient was too far from the significance level ($r = 0.24$, 5% pt. = 0.666, 10% pt. = 0.582, with 7 D. F.). This shows us that our inability to demonstrate statistically any significant positive correlation between the chiasma frequencies of the two sex-cells in some organisms cannot be taken as meaning an actual absence of correlation, but that it may be easier to demonstrate such a correlation when greater differences exist between the values in the two sex-cells. It is obvious from this preliminary study that much work is badly needed in this direction.

Summary

1. Studies have been made of the chiasma frequencies of the two sex mother-cells in each of nine bulbs of the Bluebell, *Endymion nanscriptus* (L.) GARCKE. In six of these the mean values were higher in the embryo-sac than in the pollen mother-cell, and the overall picture shows the values in the female mother-cells to be only about 1.03 times the values in the male mother-cells.

2. Data from the literature so far show that the chiasma frequency in the female mother-cell is either virtually the same as in the male mother-cell or greater by varying degrees. A case of values smaller in the female than in the male mother-cell is yet to be demonstrated.

3. A study of the relationship between the pairs of values in the two sex mother-cells of the same individuals shows an apparent absence of correlation in the present data on the Bluebell.

4. Comparison with the results from two other organisms shows that in *Dendrocoelum* where the size of differences between the chiasma frequencies of the two sex-cells was greatest, a highly significant positive

correlation could be demonstrated between the pairs of values, whereas in *Lilium longiflorum* where a moderate size of differences existed, the correlation was slight. Thus it has been argued that where the differences between the chiasma frequencies of the two sex-cells were small it may become statistically difficult to demonstrate a positive correlation between them as we might expect.

Acknowledgement. I am grateful to the authorities of the Botany School, Cambridge where this work was carried on with their advice.

Literature Cited

- BATESON, W.: Genetic segregation. *Amer. Naturalist* **55**, 5—19 (1921).
 BROCK, R. D.: Fertility in *Lilium* hybrids. *Heredity* **8**, 409—420 (1954).
 BRYDEN, WM.: The effect of sex on the frequency of chiasma formation and its relation to crossing-over in the Wistar rat. *Cytologia (Takyo)* **4**, 241—247 (1933).
 CREW, F. A. E., and P. CH. KOLLER: The sex incidence of chiasma frequency and genetical crossing-over in the mouse. *J. Genet.* **26**, 359—383 (1932).
 DARLINGTON, C. D., and L. F. LA COUR: The causal sequence of meiosis III. *J. Genet.* **41**, 49—64 (1940). — The handling of chromosomes, 2nd edit. London: Allen and Unwin.
 DUNN, L. C.: Linkage in mice and rats. *Genetics* **5**, 325—345 (1920).
 EMERSON, R. A., and C. B. HUTCHINSON: The relative frequency of crossing-over in microspore and in megaspore development in maize. *Genetics* **6**, 417—432 (1921).
 EYSTER, W. H.: The intensity of linkage between the factors for sugary endosperm and for tunicate ears and the relative frequencies of their crossing-over in microspore and megaspore development. *Genetics* **7**, 579—601 (1922).
 FOGWILL, M.: Differences in crossing-over and chromosome size in the sex-cells of *Lilium* and *Fritillaria*. *Chromosoma (Berl.)* **9**, 493—504 (1958).
 HAQUE, A.: Squash method for meiosis in ovules. *Stain Technol.* **29**, 109—112 (1954).
 HOARE, G.: Gametogenesis and fertilization in *Scilla nonscripta*. *Cellule* **42**, 269 to 292 (1934).
 NABOURS, R. K.: Parthenogenesis and crossing-over in the grouse locust, *Apotettix*. *Amer. Naturalist* **53**, 131—142 (1919).
 PASTOR, J. B., and H. G. CALLAN: Chiasma formation in spermatocytes and oocytes of the turbellarian *Dendrocoelum lacteum*. *J. Genet.* **50**, 449—454 (1952).
 STADLER, L. J.: The variability of crossing-over in maize. *Genetics* **11**, 1—37 (1926).
 WILSON, J. Y.: Chiasma frequency in relation to temperature. *Genetica* **29**, 290 to 303 (1959a). — Duration of meiosis in relation to temperature. *Heredity* **13**, 263—267 (1959b).
 WINTON, D. DE, and J. B. S. HALDANE: The genetics of *Primula sinensis*. III. Linkage in the diploid. *J. Genet.* **31**, 67—100 (1935).

J. YANNEY WILSON

Department of Botany, University College of Ghana,
 Legon, Ghana (West-Africa)

From the Inter-American Institute of Agricultural Sciences, Turrialba

NON-RANDOM DISTRIBUTION OF CHIASMATA
IN RYE, CROTALARIA AND COFFEE*

By

J. SYBENGA**

With 5 Figures in the Text

(Received February 24, 1960)

A. Introduction

In a number of organisms crossovers have been found to be distributed in a non-random manner among the chromosomes. To demonstrate the same for their cytological equivalent, chiasmata, is usually impossible. In very favorable material some conclusions concerning chiasma localization can be drawn from observations in meiotic mid-prophase. Normally, however, the material is not so favorable and frequently even the correct number of chiasmata cannot be established. Under such conditions positive indirect evidence on the concentration of chiasmata in certain chromosome arms may be obtained through statistical analysis of more reliable and more easily obtained data on chromosome associations in first meiotic metaphase. It is usually possible to determine which bivalent arms are bound (contain at least one chiasma) and which are not-bound (contain no chiasma). It can then be determined whether the distribution of bound and not-bound arms is random or not. If desired differences in chromosome arm length can be taken into account. For the binding of chromosome arms only the first chiasma is of importance, but there is little doubt that, when the distribution of these first chiasmata over the arms is not random, some portions of the chromosome complement contain systematically more chiasmata than other portions of equivalent length.

Absence of localization, however, is not proven by the failure to demonstrate deviations from randomness.

The following is based on the assumption that all bivalents of one anther or even a number of anthers from different comparable plants form one population. It has been demonstrated that for rye and *Crota-*

* The section on rye was started at the Laboratory of Genetics, director Prof. Dr. R. PRAKKEN, Agricultural University, Wageningen, Netherlands. It was completed, with the addition of the sections on *Crotalaria* and coffee, at the Inter-American Institute of Agricultural Sciences, Turrialba, C. R.

** Cytogeneticist, Nuclear Energy Program, Inter-American Institute of Agricultural Sciences, Turrialba, Costa Rica, AEC Contract AT (30-1) 2043.

laria (see Tables 4, 6 b and PRAKKEN 1943) the cells of one or even several anthers can often be considered one population in regard to number of not-bound (or bound) arms. To conclude from this that all bivalents, provided they are of equal size and shape, can be considered one population, does not seem unrealistic.

In a population of a cells with $2n$ chromosomes each there are an bivalents and $2an$ bivalent arms; the total number of bound bivalent arms is b . Now the average probability for each arm to be bound (to have at least one chiasma), when the arms have the same length, is $\frac{b}{2an}$. The following numbers of the three types of chromosome association are expected:

1. Bivalents with both arms bound (*ring* bivalents):

$$r = \left(\frac{b}{2an}\right)^2 \times an = \frac{b^2}{4an}. \quad (1)$$

2. Bivalents with one arm bound and one arm not-bound (*open* bivalents):

$$o = 2 \times \frac{b}{2an} \times \left(1 - \frac{b}{2an}\right) \times an = b - \frac{b^2}{2an}. \quad (2)$$

3. Chromosome pairs with no arms bound (*univalent* pairs):

$$u = \left(1 - \frac{b}{2an}\right)^2 \times an = an - b + \frac{b^2}{4an}. \quad (3)$$

The sum, of course, is an bivalents.

When the chromosome arms are different in length the probability of having at least one chiasma would seem proportional to the arm length, resulting in different expected frequencies of types of association. It is then necessary to determine these frequencies separately for each bivalent. When p_k and q_k are the proportions of the arms of the k^{th} bivalent of the total of $2n$ arms, with $\sum_n (p+q) = n$, the probability of one arm of bivalent k to be bound would be

$$\frac{b}{a} \times \frac{p_k}{\sum_n (p+q)} \text{ and for the other arm } \frac{b}{a} \times \frac{q_k}{\sum_n (p+q)}.$$

The number of ring bivalents would be:

$$\frac{b^2 p_k q_k}{an} \quad (4)$$

which reduces to $\frac{b^2}{4an}$ (1) for the case that all arms have the same length [$p+q=1$ and $pq=1/4$]. Similarly formulae could be derived for open bivalents and univalent pairs.

It appears, however, that this function is incorrect over practically the whole range of b . The probability of an arm being bound is not a simple function of b when the arms are not equally long. It is an asymptotic function of the „chiasma density”, the average chiasma frequency

per unit of chromosome length. For long arms the asymptote is approached with lower chiasma density than for short arms. Thus at a certain chiasma density the long arms are in the asymptotic region while the short arms are not. With increasing chiasma density the total number of bound bivalent arms still increases asymptotically, but this total number is the sum of n functions expressing the probability of each arm being bound in accordance with its length and the chiasma density. Theoretically it remains possible to estimate each separate probability for each arm to be bound from total b , arm length and the function relating this probability to chiasma density. Although of considerable interest, it will not be attempted here.

Formula (4) can be corrected in a simpler way to be of use in the case where all chromosomes are of approximately the same length, even when the arms within each chromosome differ. This correction is based on the reasoning that, when the "bonds" for the arms would be distributed at random over the chromosome complement some arms would get more than one bond, which is impossible. Thus with increasing b the randomness becomes more limited: the long arms will be "satisfied" first, so their preference for bonds over short arms will decrease with increasing b .

$$\text{When } b=0, p'q'=pq,$$

$$\text{when } b=2an, p'q'=0.25 \text{ } [p'=q'=0.5].$$

Therefore in formula (4) pq needs a correction dependent on b , giving a value $p'q'$, which can most simply be made a linear function of b of the following form:

$$p'q' = pq + \frac{b}{2an} \times (0.25 - pq). \quad (5)$$

A nearer approach to the correct formulae for numbers of associations becomes:

$$r = \frac{b^2}{an} \times \left(pq + \frac{b}{2an} (0.25 - pq) \right). \quad (6)$$

$$o = b - \frac{2b^2}{an} \left(pq + \frac{b}{2an} (0.25 - pq) \right). \quad (7)$$

$$u = an - b + \frac{b^2}{an} \left(pq + \frac{b}{2an} (0.25 - pq) \right). \quad (8)$$

These formulae are satisfactory for all values of b , but not for large arm length ratios (over 3:1), because then the effect of difference in arm length would be too severely exaggerated. Again when all arms are of the same length they reduce to (1), (2) and (3).

When the arm length ratios are not identical for all chromosomes an average arm length ratio can be used with sufficient approximation. The value pq can be derived from this ratio ($p+q=1$). When the chromosomes differ appreciably in length the formulae are not satisfactory (see p. 449) and only formulae, based on the probability of each arm being

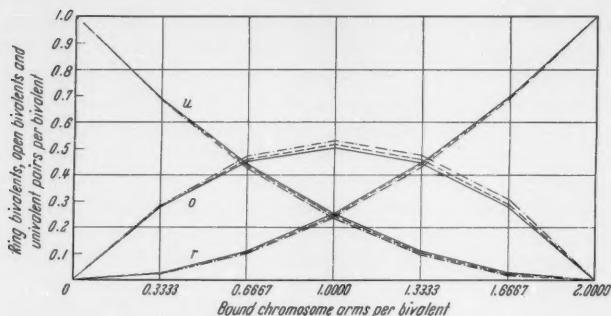


Fig. 1. Expected frequencies of the three types of chromosome association per bivalent in meiotic first metaphase. b number of bound chromosome arms, r number of ring bivalents, o number of open bivalents and u number of univalent pairs per bivalent. Calculated using formulae (6), (7) and (8) for three arm length ratios. See Table 1. — arm length ratio 1:1, ---- arm length ratio 1.5:1, -.- arm length ratio 2:1

Table 1. Expected frequencies of the three types of chromosome association in meiotic first metaphase

r =ring bivalents; o =open bivalents; u =univalent pairs. Three different arm length ratios. Calculated using formulae (6), (7) and (8). b , r , o and u given per bivalent: $an=1$.

Arm ratio = 1.0 $pq = 0.2500$				Arm ratio = 1.5 $pq = 0.2400$			Arm ratio = 2.0 $pq = 0.2222$		
b	r	o	u	r	o	u	r	o	u
0	0.0000	0.0000	1.0000	0.0000	0.0000	1.0000	0.0000	0.0000	1.0000
0.3333	0.0278	0.2778	0.6944	0.0269	0.2796	0.6935	0.0252	0.2829	0.6910
0.6667	0.1111	0.4444	0.4444	0.1081	0.4504	0.4415	0.0992	0.4683	0.4325
1.0000	0.2500	0.5000	0.2500	0.2450	0.5100	0.2450	0.2361	0.5278	0.2361
1.3333	0.4444	0.4444	0.1111	0.4385	0.4563	0.1052	0.4280	0.4774	0.0946
1.6667	0.6944	0.2778	0.0278	0.6898	0.2870	0.0232	0.6816	0.3035	0.0149
2.0000	1.0000	0.0000	0.0000	1.0000	0.0000	0.0000	1.0000	0.0000	0.0000
o -maximum: $b=1.0000$ $o=0.5000$				o -maximum: $f'(o)=1-\frac{0.48}{an} \times 2b-$ $\frac{0.01}{a^2n^2} \times 3b^2=0$ $b=1.0100$ $o=0.5101$			o -maximum: $f'(o)=1-\frac{0.4444}{an} \times 2b-$ $\frac{0.0278}{a^2n^2} \times 3b^2=0$ $b=1.0266$ $o=0.5281$		

bound, are sufficient. However, chromosomes are often of approximately the same length and as the required corrections are small when the differences between the chromosomes are not large, the formulae can be applied to a large number of organisms.

It is realized that the best stage for the measurement of chromosome length (for the calculation of arm length ratios) would be pachytene.

Accurate measurements at this stage are very difficult and as a substitute mitotic metaphase chromosomes may be measured. As the effect of small deviations in arm length is negligible, this substitution is considered acceptable.

Fig. 1 and Table 1 show the dependence of the frequency of the different chromosome associations on b and the effect of differences in chromosome arm length as expressed in arm length ratios. As examples arm length ratios of 1, 1.5 and 2 have been taken. It is seen that with increasing arm length ratio the number of open bivalents increases at the cost of ring bivalents and univalents.

B. Material and methods

Metaphase I configurations of rye (*Secale cereale*) were studied in 100 cells per plant, in gentian violet stained paraffin sections of anthers fixed in CRAF after rapid prefixation in Carnoy 3:1. The material was the progeny of a spontaneous translocation heterozygote in an inbred line. Homozygous normal and homozygous translocation plants were used, grown under different conditions at Wageningen, Netherlands.

Chromosome length in mitotic metaphase was measured in the projection of a photographic negative taken with a $100\times$, 1.25 n. a. oil objective. The preparations were aceto-orcein squashes of root tips taken from translocation heterozygotes in pots. The roots were fixed and macerated in 1-n HCl at 60° C., after pretreatment in bromo-naphthalene. After fixation the roots were rinsed in 70% alcohol. For the presented idiogram 5 cells were used. Thus for each normal arm 10 measurements are available, for each translocation-arm 5. This is sufficient for the present purpose of calculating approximate arm length ratios, although for an accurate idiogram more measurements would be necessary.

Metaphase I configurations of *Crotalaria intermedia* were studied in 30 or 50 cells per plant in aceto-carmin squash preparations of anthers fixed in Carnoy 3:1 with iron in the fixative. The material was a number of plants from the grounds of the Inter-American Institute of Agricultural Sciences, Turrialba, Costa Rica.

Chromosome length in mitotic metaphase was measured in the same type of preparation as used for rye, but measured with an ocular screw micrometer and a $100\times$, 1.3 n. a. oil lens. As has been found in previous studies (SYBENGA 1959) the accuracy of the two types of measurement is the same. Only two cells were measured. For a good idiogram more are needed, but the variation between cells was so small that this was considered sufficient for the calculation of the average arm length ratio. Thus for each chromosome arm four measurements were available.

Metaphase I and diakinesis configurations in a number of species of *Coffea* were not studied by the present author, but data were taken from the literature: LELIVELD (1940), MENDES (1950) and MEDINA (1952).

Probably both sectioned and squashed material were used. Mitotic metaphase chromosomes were measured by BOUHARMONT (1959), who gives an idiogram for the whole genus *Coffea*, the species of which appear to differ only slightly in chromosome characteristics. His measurements were performed on a large number of cells in sectioned material stained mainly with gentian violet after CRAF fixation. Camera lucida drawings were used.

C. Results

Secale cereale

The idiogram mentioned above is given in Fig. 2. The average arm length ratio is 1.376 for the normal chromosome and 1.349 for the translocation complement, for calculation simplified to 1.4, and 1.3 respectively.

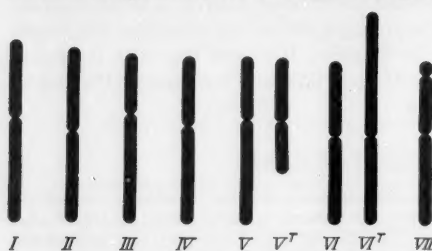


Fig. 2. Idiogram of *Secale cereale*. $n=7$. V^T and VI^T are chromosomes V and VI with translocation, as described in the text

Table 2 gives the percentage of the total length for each chromosome arm.

It is seen that the translocation has greatly increased the coefficient of variability between chromosomes. Chromosome V with subterminal centromere has lost the greater part of its long arm to chromo-

somes VI with median centromere, which returned only a small fraction of one of its arms. As a result chromosome V became a small chromosome with median centromere and chromosome VI a large chromosome with submedian centromere. The heterozygote shows frequent trivalents and somewhat less frequent quadrivalents in meiosis. The effect of this translocation on the chiasma distribution will be considered below.

Table 2. Length of chromosomes in rye, *Secale cereale*, in percent of total length, and arm length ratios

Five cells of translocation heterozygotes. See also Fig. 2.

Chromosome	Centromere	% of total complement			Arm length ratio
		long arm	short arm	sum	
I	submedian	8.88	6.54	15.42	1.359
II	median	7.78	7.10	14.88	1.096
III	subterminal	9.12	5.15	14.27	1.770
IV	submedian	8.10	6.00	14.10	1.351
V normal . . .	subterminal	8.74	5.29	14.03	1.652
V transloc. . .	median	5.29	4.56	9.85	1.160
VI normal . . .	median	7.30	6.42	13.72	1.138
VI transloc. . .	submedian	10.60	7.30	17.90	1.452
VII SAT	submedian	7.58	6.00	13.58	1.264
		Total	100.00	9.630	transloc.
		Average	14.29	1.376	9.452
					1.349

Coefficient of variability of the normal complement 4.57.

Coefficient of variability of the translocation complement 16.88.

Table 3. Numbers of ring-bivalents (r), open bivalents (o), and univalent pairs (u) in translocation and normal plants, derived from the same inbred translocation heterozygote, of *Secale cereale* as observed in 100 cells per plant; as calculated from the total number of bound bivalent arms b on basis of equal arm length; and as calculated from b on basis of arm length ratio 1.4

Plant	Observed				Expected, ratio = 1				Expected, ratio = 1.4			
	b	r	o	u	r	o	u	χ^2	r	o	u	χ^2
Translocation plants												
eD7	1202	535	132	33	516.0	170.0	14.0	34.980**	514.8	172.4	12.8	42.138**
bC3	1172	487	198	15	590.6	190.8	18.6	0.964	489.2	193.6	17.2	0.391
g2F8	1233	546	141	13	543.0	147.0	10.0	1.162	541.9	149.2	8.9	2.371
g2Vtr	1305	609	87	4	608.2	88.6	3.2	0.230	607.5	90.0	2.5	1.004
g2V1	1317	623	71	6	619.5	78.0	2.5	5.565*	618.7	79.6	1.7	11.835**
b1V	1231	552	127	21	541.2	148.6	10.2	14.791**	540.1	150.8	9.1	19.580**
b1pvr	1203	526	151	23	516.9	169.2	13.9	8.076*	515.6	171.8	12.6	11.312**
b1p1	1192	519	154	27	507.5	177.0	15.5	11.789**	506.2	179.6	14.2	15.611**
b1B31	1147	496	155	49	469.9	207.2	22.9	44.392**	468.4	210.2	21.4	51.718**
b2B2	1239	552	135	13	548.3	142.4	9.3	1.892	547.2	144.6	8.2	3.489
b2v	1252	565	122	13	559.8	132.4	7.8	4.332	558.7	134.6	6.7	7.174*
eC11vtr	1165	485	195	20	484.7	195.6	19.7	0.007	483.4	198.2	18.4	0.196
eC111	1132	462	208	30	457.7	216.6	25.7	1.108	456.2	219.6	24.2	2.077
eB1	1198	526	146	28	512.6	172.8	14.6	16.834**	511.3	175.4	13.3	21.598**
h213	965	352	261	87	332.6	299.8	67.6	11.720**	330.9	303.2	65.9	13.974**
total:	17953	7835	2283	382	7674.1	2604.8	231.1	160.221**	7655.6	2641.8	202.6	211.774**
Normal plants												
aA21	1222	531	160	9	533.3	155.4	11.3	0.614	531.6	158.8	9.6	0.048
bC21	1158	473	212	15	478.9	200.2	20.9	2.373	476.8	204.4	18.8	1.081
b1pvr	1098	417	264	19	430.6	236.9	32.6	9.204**	428.2	241.6	30.2	6.524*
b2B5vtr	1130	451	237	12	463.3	212.3	24.3	9.427**	461.1	216.8	22.1	7.318*
b2p	1170	476	218	6	488.9	192.2	18.9	12.608**	486.7	196.6	16.7	9.420**
bD3	1058	387	284	29	399.8	258.4	41.8	6.866*	397.2	263.6	39.2	4.486
eB71	1197	507	183	10	511.7	173.6	14.7	2.055	509.9	177.2	12.9	0.860
g2pvr	1116	433	250	17	444.8	226.4	28.8	7.673*	442.5	231.0	26.5	5.173
total:	9158	3675	1808	117	3744.2	1669.6	186.2	38.470**	3726.2	1705.6	168.2	22.437**

Asterisks indicate level of probability for χ^2 of difference between observed and expected numbers.

In normal crossbred plants of rye the chiasma frequency is so high that few open bivalents and practically no univalents occur. It has been shown, however, that upon inbreeding the chiasma frequency drops considerably to a constant level, the inbreeding minimum (MÜNTZING and AKDIK, 1948; REES, 1955; SYBENGA, 1958). Around this minimum a sufficient number of univalents appears, to make a statistical analysis of the distribution of bound chromosome arms possible. The inbred line used is representative of the general picture in rye, where many inbred lines have been studied. The translocation mentioned arose spontaneously after about 5 generations of inbreeding, when the minimum

Table 4. *Distribution of numbers of not-bound bivalent-arms per cell in normal and translocation plants of Secale cereale compared to Poisson series*
The number of not-bound arms varies from 0 to 9 per cell.

Class	Translocation plants		Normal plants	
	frequency observed	frequency expected (Poisson)	frequency observed	frequency expected (Poisson)
0	178	196.7	39	62.3
1	404	399.6	138	159.0
2	435	405.8	233	203.0
3	275	274.8	205	172.7
4	128	139.5	119	110.2
5	54	56.7	54	56.3
6	18	19.2	8	23.9
7	7	5.6	3	8.7
8	0	1.4	1	2.8
9	1	0.3	0	0.8
1500 cells $\mu = 2.0313$ $s^2 = 1.925$		$\chi^2 = 5.146$ not significant	800 cells $\mu = 2.5525$ $s^2 = 1.8220$ $\chi^2 = 38.927$, significant	

is approached. It was maintained in the heterozygous state, and the plants used are the progeny of such a heterozygote in the seventh generation of inbreeding. Therefore normal and translocation plants are comparable in respect to chiasma frequency.

Table 3 presents the number of ring-(r) and open (o) bivalents and univalent pairs (u) found, calculated with formulae (1), (2) and (3) and calculated with formulae (6), (7) and (8). Fifteen plants with translocation were studied, eight without. It is not necessary to calculate a heterogeneity χ^2 , as practically all plants can be seen to behave similarly within the groups. It may be interesting to check whether all cells can be considered a single population. As seen in Table 4 the numbers of cells in successive classes with respect to number of not-bound chromosome arms per cell, fit a Poisson series for the translocation plants. The fit is less perfect for the normal plants, where a significant difference is

found. This is probably due to the combination of a small number of plants grown under different conditions which affect the chromosome association.

Considering the normal plants (Table 3) it is seen that the ring-bivalents and the univalents always show a shortage, only partly explained by difference in arm length, which favors the formation of open bivalents. The distribution of "bonds" over the arms is not random, nor proportional to arm length. This indicates a non-random distribution of chiasmata, or chiasma localization.

Considering the translocation plants, a different situation is found. Here an excess of univalents occurs, increased in significance when arm length ratio is taken into account, and apparently more than compensating a possible univalent shortage. This is most easily explained by assuming that the excess of univalents is formed by the newly formed short chromosome pair, which is also suggested by Table 5. This shows

Table 5. *Distribution of numbers of univalent pairs per cell in translocation and normal plants of Secale cereale compared to Poisson series*

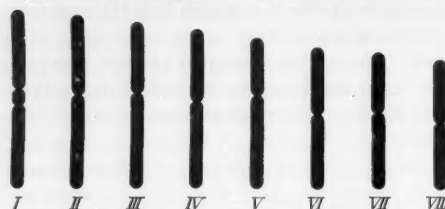
Class (univalent- pairs per cell)	Translocation plants		Normal plants	
	frequency observed	frequency expected (Poisson)	frequency observed	frequency expected (Poisson)
0	1143	1162.9	687	691.1
1	333	296.2	109	101.1
2	23	37.7	4	7.4
3	1	3.2	0	0.4
	1500		800	
	$\mu = 0.2547$ $\sigma^2 = 0.2246$	$\chi^2 = 11.911$ significant	$\mu = 0.1463$ $\sigma^2 = 0.1551$	$\chi^2 = 2.461$ n. s.

that the number of univalents per cell follows a Poisson series in the normal plants, as expected, even though the total number of not-bound arms per cell was not so regular. In the translocation plants, however, it appears that the excess univalents are found in the class of one pair per cell, indicating that probably one particular chromosome pair is responsible for this. It is clear that in such a case formulae (6), (7) and (8) are not sufficient.

In rye, where normally few if any arms are not-bound, a small new chromosome will have little disadvantage in meiosis in the population. In other organisms, where less association is found, such small new chromosomes must have a disadvantage, acting against the maintenance of some translocations. A newly adapted system of chiasma localization ("pairing blocks") would be necessary to overcome this disadvantage.

Crotalaria intermedia

The idiogram mentioned is given in Fig. 3. The average arm length ratio is 1.28, simplified to 1.3 for the calculations. The coefficient of variability of the chromosomes in the genome is 12.46. Table 6 presents the data for *Crotalaria intermedia* with respect to chromosome associations in meta-phase I of meiosis. It is seen that the number of

Fig. 3. Idiogram of *Crotalaria intermedia*. $n = 8$ Table 6a. Numbers of ring bivalents (r), open bivalents (o), and univalent pairs (u) in *Crotalaria intermedia* as observed and as calculated from the total number of bound bivalent arms b on basis of arm length ratio 1.3

Plant	Number of cells	Observed				Expected, ratio 1.3			
		b	r	o	u	r	o	u	χ^2
a	30	408	169	70	1	172.98	62.04	4.98	—
b1	30	420	181	58	1	183.38	53.24	3.38	—
b2	50	700	300	100	0	305.64	88.72	5.64	—
c1	50	705	306	93	1	310.02	84.96	5.02	—
c2	50	690	291	108	1	296.85	96.30	6.85	—
d	50	743	343	57	0	344.62	53.76	1.62	—
total:	260	3666	1590	486	4	1612.10	441.80	26.10	23.438 significant

Table 6b. Distribution of numbers of not-bound bivalent arms per cell in *Crotalaria intermedia* compared to a Poisson series

Class	Frequency observed	Frequency expected (Poisson)
0	30	38.89
1	76	73.89
2	76	70.19
3	51	44.46
4	23	21.12
5	3	8.02
6	1	2.54
7	0	0.69

$$\mu = 1.900 \quad \chi^2 = 8.549$$

$$s^2 = 1.465 \quad \text{not significant}$$

not-bound arms per cell again follows a Poisson series, even when all plants are taken together. Apparently no great differences between plants exist in the material used.

Again the distribution of bonds over chromosome arms is not random, indicating localization of chiasmata.

Coffea

The idiogram of the genus *Coffea* is taken from BOUHARMONT (1959) and presented in Fig. 4. The average arm length ratio is simplified to

1.4. The coefficient of variation between the chromosomes is approximately 21.9, a rather large figure. Table 7 presents the data for chromo-

Table 7. Numbers of ring bivalents (r), open bivalents (o) and univalent pairs (u) in several species and varieties of *Coffea* as observed and as calculated from the total number of bound bivalent arms on basis of arm length ratio 1.4

Data of LELIVELD (1940) on diakinesis, of MENDES (1950) and MEDINA (1952) on metaphase I. All differences between observed and expected numbers are statistically significant except those for *C. canephora* SA 109. All original data had to be adapted.

Coffea species	Plant	Observed			Expected, ratio = 1.4			Authors and material
		b	r	o	u	r	o	
<i>C. canephora</i> (<i>robusta</i>) ($n = 11$)	SA 7	1810	710	390	0	740.99	328.02	100 cells, LELIVELD (1940)
	SA 13	1834	744	346	10	761.08	311.84	100 cells, LELIVELD (1940)
	SA 24	1699	603	493	4	651.85	395.30	100 cells, LELIVELD (1940)
	SA 56	1691	599	493	8	645.72	399.56	100 cells, LELIVELD (1940)
	SA 75b	1736	640	456	4	680.82	374.36	100 cells, LELIVELD (1940)
	SA 85	1756	660	436	4	696.88	362.24	100 cells, LELIVELD (1940)
	SA 109	1837	755	327	18	763.57	309.86	100 cells, LELIVELD (1940)
	SA 113	1622	530	562	8	593.62	434.76	100 cells, LELIVELD (1940)
	SA 142-02	1733	635	463	2	678.47	376.06	100 cells, LELIVELD (1940)
	BP 42	1655	571	513	16	618.27	418.46	100 cells, LELIVELD (1940)
	total	17373	6447	4479	74	6819.78	3733.44	1000 cells
<i>C. congensis</i> ($n = 11$)		1147	195	757	27	329.78	487.44	89 cells, MENDES (1950)
	Bgn 2a	1718	624	470	6	666.78	384.44	100 cells, LELIVELD (1940)
	Bgn 1a	1762	666	430	4	701.65	358.70	100 cells, LELIVELD (1940)
	Bgn 121-10	1662	585	492	23	623.51	414.98	100 cells, LELIVELD (1940)
	SA 4	1660	580	500	20	622.01	415.98	100 cells, LELIVELD (1940)
<i>C. devesveti</i> (<i>excoleta</i>) ($n = 11$)		531	124	283	0	171.73	187.53	37 cells, MEDINA (1952)
	P. P. 21	1819	719	381	0	748.38	322.24	100 cells, LELIVELD (1940)
		1719	631	457	12	667.55	383.90	100 cells, LELIVELD (1940)
<i>C. dybowskii</i> ($n = 11$)		1900	802	296	2	817.50	265.00	100 cells, LELIVELD (1940)
		1330	846	846	24	1389.00	728.00	100 cells, LELIVELD (1940)
<i>C. kapakata</i> ($n = 11$)	Santos	3506						
<i>C. arabica</i> ($n = 22$)								

some associations. Some adaptations and even some corrections had to be made before the data could be used for the present purpose (SYBENGA 1960).

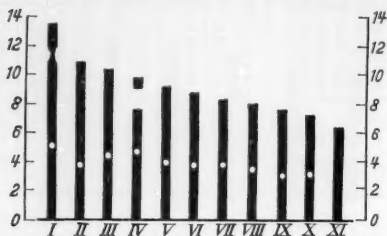


Fig. 4. Idiogram of *Coffea* (BOUHARMONT 1959). $n=11$

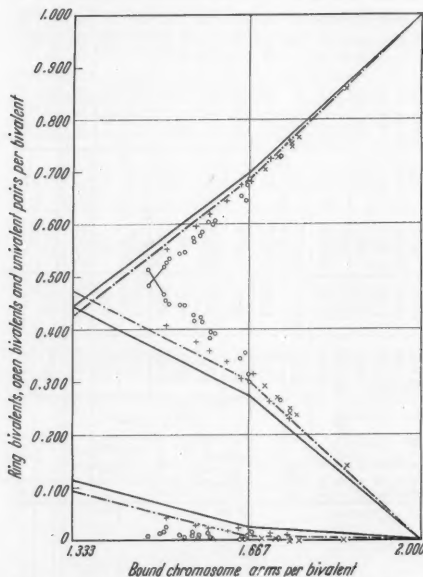


Fig. 5. Part of Fig. 1 with observed values added.
— r, o or u per bivalent, with arm length ratio 1:1;
--- r, o or u per bivalent, with arm length ratio 2:1;
○ *Coffea* (only data taken from LELIVELD 1940; those from the other two authors fall just outside the field covered.); + *Secale cereale* (normal, inbred plants);
× *Crotalaria intermedia*

gives an impression of the intensity of localization, and can be called the coefficient of localization, here 1.8. Similarly the line of *Crotalaria*

The table shows clearly that also in *Coffea* non-random distribution of bonds is prevalent in almost all species considered. Pooling of the data is not very practicable as too many different species and forms, even with different chromosome numbers, and both self- and cross pollinating species are involved. On the whole there is a strong tendency to deviate in the same direction. In almost all cases sufficiently large numbers of cells have been studied to show a statistically significant difference. Again in *Coffea* we must infer localization of chiasmata.

When the data for each type of plant are plotted in Fig. 1, (see Fig. 5) it is found that each plant has its own line on which the points fall. For rye this line coincides approximately with that expected when the arm length ratio is 2.5, while the arm length ratio measured was 1.4. The quotient of these two ratios

intermedia suggests an arm length ratio of 3, giving a coefficient of localization of 2.3. For *Coffea* the line suggests a ratio of 4, giving a coefficient of 2.9. Not too much value should be attached to these coefficients, as the effect of localization may either increase or decrease the effect of arm length differences. Moreover, a correct estimation of the line of each type of organisms requires better formulae.

D. Conclusions and discussion

The deviation of the observations from expectation is probably real. Arm length ratio is taken into account with a formula that exaggerates the correction slightly, while variations in total chromosome length would lead to opposite results, as is shown by the translocation in rye. The non-random distribution of bound chromosome arms must reflect a localization of chiasmata in some parts of the chromosome complement, which could not be detected directly. This localization is apparently of general occurrence, as it is found in three very different types of plants: a cross pollinating, self sterile, annual diploid grass of temperate regions (rye); a self pollinating, annual, diploid tropical legume (*Crotalaria intermedia*), two types of perennial tropical *Rubiaceae*: several cross pollinating, self sterile, diploid species of *Coffea* and a self pollinating tetraploid, *Coffea arabica*. In addition it has been found in a number of organisms by other authors by direct observation of chiasmata, leading to the concept of "pairing blocks".

It is clear that a localization that results in the frequent formation of univalents will not be effective. Only one of the arms of any bivalent can be left without appreciable probability of being bound. It is thus logical that the deviation from randomness is in the direction of excess of open bivalents. This method cannot determine whether such localization occurs in normal population plants of rye also. This is probable, however, as it is found in practically every inbred line as soon as the reduction in chromosome association is sufficient to permit a test as applied here (unpublished data). It was further found, however, that in the asynaptic rye material, described by PRAKKEN (1943), the few bonds present were distributed entirely at random over the arms. Here the localization must have been lost, or replaced by another type.

Strong across-centromere interference could give an effect similar to the one found. It is probable, however, that in coffee this across centromere effect is negligible (SYBENGA 1960). This is generally accepted in other organisms also and therefore not considered of importance for the distribution of bound chromosome arms.

Another form of non-random distribution of chiasmata is the negative correlation in chiasma frequency between bivalents in one cell (MATHER and LAMM 1935, for rye; HARTE 1956, for *Paeonia*). This between-

bivalent effect, however, should result in the opposite of what is found here. Thus it cannot be the explanation of this type of chiasma localization. It points in the direction of a tendency to limit the number of chiasmata without reducing the chance of crossing over too strongly for specific regions of the chromosome. In excessive form it could be a danger to meiosis, as the formation of univalents could result. The form of non-random chiasma distribution described here will also limit the number of chiasmata, but now without endangering meiosis, although it will reduce the probability of crossing over in some chromosome regions considerably. To what extent this localization is absolute for some chromosome regions cannot be determined.

A tendency to limit the number of chiasmata may be one cause for chiasma localization. Another may be the desirability for certain genic blocks to remain intact. Whatever the reason, an effective localization can only be established when it is balanced against other important factors like stable meiosis and sufficient gene exchange.

When chiasma localization becomes important it may affect the results of cytological studies based on chiasma frequencies, like the improved method for the study of pairing relationships in genome analysis, proposed by GAUL (1954).

Summary

The two arms of a bivalent can be bound (contain at least one chiasma) or not-bound (contain no chiasma). Formulae are presented to test the randomness of distribution of the bound arms over the chromosome complement, under the assumption that the probability of being bound is related to the arm length.

Testing meiotic configurations in *Secale cereale* (rye), *Crotalaria intermedia* and several species of *Coffea*, non-randomness was found in all cases, resulting in an excess of bivalents with only one arm bound. The effect is slightly different in the different plants. The basis is considered to be localization of chiasmata.

In rye plants, homozygous for a rather large translocation, an excess of univalents was observed to more than compensate the localization effect. This is attributed to the limited probability of the newly formed short arm of the small translocation chromosome to be bound.

Literature

- BOUHARMONT, J.: Recherches sur les affinités chromosomiques dans le genre *Coffea*. Publ. I.N.E.A.C., Sér. Sci. 77, 94 p. (1959).
GAUL, H.: Asynapsis und ihre Bedeutung für die Genomanalyse. Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre 86, 69—100 (1954).
HARTE, C.: Untersuchungen über die Variabilität der Chiasmenbildung bei *Paeonia tenuifolia*. Chromosoma (Berl.) 8, 152—182 (1956).

- LELIVELD, J. A.: Nieuwe gezichtspunten voor het selectieonderzoek bij soortskruisingen van koffie naar aanleiding van cytologische gegevens. *Bergcultures* **14**, (12), 370—386 (1940).
- MATHER, K., and R. LAMM: The negative correlation of chiasma frequencies. *Hereditas* (Lund) **20**, 65—70 (1935).
- MEDINA, D. M.: Observações citológicas em *Coffea* XIX. Microsporogênese em *Coffea dewevrei*. *Bragantia* **12**, 153—162 (1952).
- MENDES, C. H. T.: Observações citológicas em *Coffea* XVI. Microsporogênese em *Coffea canephora* PIERRE ex FROEHNER. *Bragantia* **10**, 97—104 (1950).
- MÜNTZING, A., and S. AKDIK: Cytological disturbances in the first inbred generations of rye. *Hereditas* (Lund) **34**, 485—509 (1948).
- PRAKKEN, R.: Studies of asynapsis in rye. *Hereditas* (Lund) **29**, 475—495 (1943).
- REES, H.: Genotypic control of chromosome behaviour in rye. I. Inbred lines. *Heredity* **9**, 93—116 (1955).
- SYBENGA, J.: Inbreeding effects in rye. *Z. Vererb.-Lehre* **89**, 338—354 (1958). — Some sources of error in the determination of chromosome length. *Chromosoma* (Berl.) **10**, 335—364 (1959). — Genetics and cytology of coffee. *Bibliogr. genet.* 1960 (in press).

Dr. J. SYBENGA
Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas
Turrialba, Costa Rica

Aus dem Botanischen Institut der Universität Wien

BEITRÄGE ZUM STERILITÄTS- UND BEFRUCHTUNGS-
PROBLEM VON *RHOEO DISCOLOR*

Von

K. CARNIEL

Mit 2 Textabbildungen

(Eingegangen am 27. Juni 1960)

Die Meiose in den Pollenmutterzellen und die Sterilitätsverhältnisse des männlichen Gametophyten von *Rhoeo discolor* wurden vielfach untersucht (Literaturangaben bei TSCHERMAK-WOESS 1947, 1951): Die zwölf Chromosomen hängen von der Diakinese bis zur ersten Metaphase mit ihren Enden zusammen und bilden einen \pm geschlossenen Ring. Die Anordnung der Chromosomen im Ring ist während der Metaphase I in 70—90% der Pollenmutterzellen non-disjunctional, wodurch nach der bisherigen Auffassung 70—90%ige Pollensterilität verursacht werden soll. Dagegen ist der Meioseablauf in den Makrosporenmutterzellen — abgesehen von einzelnen Angaben [so beobachtete DARLINGTON gelegentlich non-disjunction; TSCHERMAK-WOESS (1947, 1951) vermutete eine regelmäßige „disjunctional“ Chromosomenanordnung während der Metaphase I] — praktisch unbekannt. Bezüglich der Sterilität der weiblichen Gametophyten stellte TSCHERMAK-WOESS (1947, 1951) fest, daß genau 50% der Samenanlagen steril sind. Dies wurde damit zu erklären versucht, daß die Meiose in den Embryosackmutterzellen streng gesetzmäßig, und zwar disjunctional abläuft und gonische Letalität bestünde. Demnach müßte der Meioseablauf in Makro- und Mikrosporenmutterzellen grundsätzlich verschieden sein. Nach DARLINGTON sind aber mehr als 50% der Samenanlagen steril.

Es war nun die Aufgabe der vorliegenden Arbeit, das Meiosegeschehen in den Embryosackmutterzellen festzustellen und mit demjenigen in den Pollenmutterzellen zu vergleichen. Außerdem sollten die Sterilitätsverhältnisse des Pollens und der Samenanlagen und deren Ursachen überprüft werden.

Als Material dienten Pflanzen von *Rhoeo discolor*, die in der von CARNIEL (1960a, b) dargestellten Weise kultiviert, fixiert, präpariert und gefärbt wurden. Weiter wurden Hand- und Mikrotomschnitte von Samenanlagen und Samen verschiedener Entwicklungsstufen angefertigt. Im ersten Fall erfolgte die Fixierung in Alkohol-Eisessig (3:1) und die Färbung mit Essigkarmin, im zweiten wurde in Karpetschenko-Gemisch fixiert und mit Kristallviolett nach OEHLKERS gefärbt.

Bei der Komplexheterozygoten *Rhoeo discolor* läuft die Meiose in den Embryosackmutterzellen zunächst analog wie in den Pollenmutterzellen ab, und zwar paaren sich nur die relativ kurzen Endsegmente der zwölf

Chromosomen. In der Folge terminalisieren die Chiasmata, wodurch die Chromosomen an ihren Enden verbunden bleiben und einen Ring bilden, der manchmal an einer Stelle unterbrochen ist — in den Pollenmutterzellen ist er dagegen oft an mehreren unterbrochen (vgl. CARNIEL 1960a; STRAUB). Die Einordnung der Chromosomen in die Spindel erfolgt nun nicht in regelmäßiger Zickzackform, sondern die Anordnung ist fast immer non-disjunctional entweder äqual oder inäqual. Die Analyse von 41 Metaphasen I ergab, daß die Chromosomenkonfiguration 22mal äqual und 17mal inäqual non-disjunctional war, und zwar derartig, daß immer nur zwei und nicht drei benachbarte Chromosomen zum gleichen Pol gerichtet waren (Abb. 1a und b); ein Ring konnte nicht eindeutig aufgelöst werden und einer war verklummt. Anzeichen für Polarisierungsvorgänge, in dem Sinn, daß ein bestimmter Komplex nur dem chalazalen oder nur dem mikropylaren Pol der Embryosackmutterzelle zugeteilt würde, konnte nicht gefunden werden. Im Gegenteil, die Verteilung erfolgt immer nach dem Ge-



Abb. 1a u. b. *Rhoeo discolor*. a, b Metaphasen I in Embryosackmutterzellen, a äquale Non-disjunction, b inäquale Non-disjunction. — Alkohol-Eisessig, Essigkarmin

setz des Zufalls, wie auch aus dem Verhalten der inäqualen Non-disjunction-Fälle hervorgeht. Das Verhältnis von 22 äqualen zu 17 inäqualen Fällen von Non-disjunction entspricht fast genau dem für einen 12er-Ring theoretisch geforderten Verhältnis, das 5:4 beträgt. Infolge der offenbar obligaten „non-disjunction“-Anordnung ist die Anaphaseverteilung der Chromosomen nie durchgehend alternativ, sondern für gewisse Chromosomen „adjacent“. Nach äqualer Non-disjunction entstehen Dyadenzellen, deren Kerne wohl sechs Chromosomen haben, aber nicht die Konstitution 1.2, 3.4, 5.6, 7.8, 9.10, 11.12 und 2.3, 4.5, 6.7, 8.9, 10.11, 12.1, sondern z. B. 1.2, 2.3, 5.6, 7.8, 9.10, 11.12 und 3.4, 4.5, 6.7, 8.9, 10.11, 12.1. Nach inäqualer Non-disjunction sollten die Dyadenzellen Kerne mit 5 und 7 Chromosomen besitzen. Dies ist jedoch nicht immer der Fall, sondern sehr häufig entstehen Kerne mit 5 und 6 Chromosomen. Diese Erscheinung wird dadurch verursacht, daß ein Chromosom, und zwar offenbar eines der „adjacents“ aus der Siebener-Gruppe, in der Metaphaseebene liegen bleibt (Abb. 2a) oder bei der Anaphasebewegung nachhinkt und dadurch beim Übergang zum Ruhekern außerhalb der Kernmembran bleibt und ein Karyomer bildet. Infolgedessen gehen nach inäqualer Non-disjunction sechschromosomige Dyadenzellen mit der gleichen Konstitution hervor wie solche nach

äqualer Non-disjunction (1.2, 2.3, 4.5, 5.6, 7.8, 9.10, 11.12 und 3.4, 6.7, 8.9, 10.11, 12.1; fällt z.B. 4.5 aus, so ist das Resultat: 1.2, 2.3, 5.6, 7.8, 9.10, 11.12). Demnach sind das Ergebnis der ersten meiotischen Teilung Dyaden, deren Zellen Kerne mit meistens 6, weniger oft mit 5 und am seltensten mit 7 Chromosomen besitzen.

Die zweite meiotische Teilung läuft nicht in allen Dyadenzellen gleich ab. Es herrschen nämlich im Nuzellus physiologische Bedingungen, die zunächst die Kernteilung in der mikropylaren Dyadenzelle stark schädigen und schließlich die ganze Zelle zum Absterben bringen. In manchen Fällen werden noch 2 Kerne gebildet, meist verklumpen aber schon die Meta- oder frühen Anaphasen und gehen zugrunde. In der chalazalen Dyadenzelle geht die Kernteilung meist ohne Störung vor sich. In einzelnen Fällen werden jedoch Karyomeren gebildet und außerdem unterbleibt immer die Zellwandbildung. Bald nachdem die Zellen zweikernig werden, degenerieren 50%. Da Polarisierungsvorgänge auszuschließen sind (vgl. oben), geht daraus hervor, daß einerseits nur die Hälfte der Komplexe im weiblichen Geschlecht lebensfähig ist — es liegt also offenbar ein haplophasischer Letalfaktor vor — und daß andererseits in der mikropylaren Dyadenzelle tatsächlich besondere physiologische Faktoren wirksam sind, da ein lebensfähiger Komplex sowohl in die mikropylare als auch in die chalazale Dyadenzelle gelangt, in der mikropylaren aber immer degeneriert. Daß alle mikropylaren und 50% der chalazalen Dyadenzellen absterben, bedeutet, daß insgesamt 75% der Dyadenzellen zugrunde gehen und nur 25% sich weiterentwickeln. Die genaue Auszählung ergab 243 (= 100% der mikropylaren) abgestorbene mikropylare, 126 (= 51,8% der chalazalen) abgestorbene chalazale und 117 (= 48,2% der chalazalen) lebende zweikernige chalazale Dyadenzellen. Von insgesamt 486 Dyadenzellen waren also 369 (75,9%) abgestorben und 117 (24,1%) lebend. Es besteht somit eine 75%ige Letalität der weiblichen Dyadenzellen; dies entspricht dem gleichen Prozentsatz der Makrosporenletalität; für sich abgegrenzte Makrosporen werden allerdings nicht ausgebildet, da die Entwicklung des Embryosackes nach dem *Allium*-Typ erfolgt (vgl. TSCHERMAK-WOESS 1947). Während der folgenden Reifung des Embryosackes treten keine Degenerationserscheinungen mehr auf, sondern es gehen praktisch aus allen entwicklungsfähigen (25%) Dyadenzellen normale Embryosäcke hervor, wie eine Zählung der sterilen und fertilen Samenanlagen zur Zeit des Aufblühens ergab. Von 94 Samenanlagen waren 49 (52,1%) steril und 45 (47,9%) fertil. Hiermit werden die Angaben von TSCHERMAK-WOESS (1947, 1951) über 50% Sterilität der Samenanlagen von *Rhoeo discolor* bestätigt. Die Chromosomenzahl der Embryosackkerne beträgt meist sechs (vgl. CARNIEL 1960b; Abb. 3), in einzelnen Fällen bis zum Vierkern-Stadium aber auch sieben (Abb. 2b). Ob es ausnahms-

weise reife Embryosäcke mit einer $n+1$ - oder $n-1$ -Konstitution gibt, muß dahingestellt bleiben.

Vergleicht man den Meioseablauf und die Entwicklung des Gametophyten, in den Samenanlagen und in den Mikrosporangien, so kann man feststellen, daß im allgemeinen gleiche Tendenzen bestehen, die im einzelnen jedoch gewisse Modifikationen erfahren. So ist die Chromosomenkonfiguration während der Metaphase I, die vorwiegend non-dis-

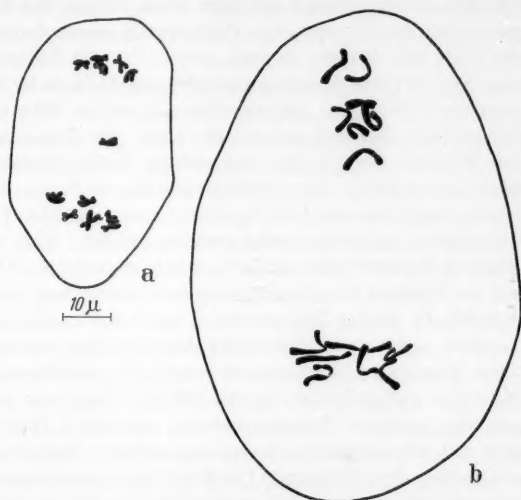


Abb. 2a u. b. *Rhoeo discolor*. a Anaphase I in einer Embryosackmutterzelle nach inäqualer Non-disjunction mit einem in der Äquatorialebene zurückbleibenden Chromosom, b späte Prophasen mit 7 Chromosomen im zweikernigen Embryosack (mikropylarer Pol in a und b oben). — Alkohol-Eisessig, Essigkarmin

junctional ist, in den Pollenmutterzellen im Gegensatz zu den Embryosackmutterzellen manchmal (10—20%) disjunctional. Dieser Unterschied ist zum Teil darauf zurückzuführen, daß in den Pollenmutterzellen an Stelle eines geschlossenen Ringes sehr häufig Ketten gebildet werden (vgl. CARNIEL 1960a). Wie nämlich schon SAX und ANDERSON betonten, ist eine Non-disjunction im Ring zwangsläufig eher zu erwarten als in der Kette. Das Verhältnis zwischen äqualer und inäqualer Non-disjunction ist in den Pollenmutterzellen (344:278) genau so wie in den Embryosackmutterzellen annähernd 5:4. Die Karyomerenbildung erfolgt in beiden Geschlechtern auf die gleiche Art und Weise und führt zum gleichen Resultat (vgl. oben).

Bezüglich der Sterilitätsverhältnisse ist folgendes zu bemerken: Der genau 75% betragenden Sterilität der weiblichen Dyadenzellen (= Gonensterilität, mit den oben gemachten Einschränkungen) steht eine zwischen

70—90% schwankende Sterilität der männlichen Gonen gegenüber. Die Sterilität ist also in beiden Fällen ungefähr gleich hoch. Was sind nun die Ursachen der Sterilität? Wie bereits erwähnt, geht die Sterilität in den Samenanlagen zum Teil auf einen haplophasischen Letalfaktor, teils auf Letalität durch physiologische Faktoren zurück und nicht auf Non-disjunction, die im allgemeinen als Letalität hervorruhend betrachtet wird. Wäre Non-disjunction die Ursache, dann müßte in den Embryosackmutterzellen die Metaphase I entweder bei Annahme von Polarisierung in jedem zweiten Fall oder ohne Polarisierung *immer* disjunctional sein; beides trifft jedoch nicht zu (vgl. oben). Für die Pollensterilität wurde bisher Non-disjunction verantwortlich gemacht, weil der Prozentsatz der sterilen Pollenkörner und der Non-disjunction-Fälle ungefähr gleich groß ist (vgl. SAX und ANDERSON; u. a.). Bei dieser Annahme würden nur Pollenkörner mit dem regelrechten Sechser-Komplex sich normal weiter entwickeln. Dies erscheint jedoch, sei es aus Analogiegründen, sei es wegen der damit im Zusammenhang stehenden Probleme bei der Befruchtung (vgl. unten) sehr unwahrscheinlich. Eher ist anzunehmen, daß die Pollensterilität zu 50%, wie beim weiblichen Gametophyten, auf die Wirkung eines haplophasischen Letalfaktors beruht und zusätzlich durch die häufige Bildung von 2 und 3 Ketten die Komplexstruktur so stark gestört wird, daß sterile Pollenkörner entstehen.

Da in den Eizellen praktisch nie ein regelmäßig zusammengesetzter Sechser-Komplex vorhanden ist, erhebt sich die Frage: wie kommt in der Zygote der normale Chromosomensatz zustande? Oder gibt es Embryonen mit abweichenden Chromosomenzahlen ähnlich den Trisomen bei *Oenothera* (vgl. RENNER)? Die Befruchtung durch eine Spermazelle mit regelmäßigem Sechser-Komplex würde eine Zygote mit un- ausgeglichenem Chromosomensatz ergeben, was zu einer früheren oder späteren Letalität der Embryonen führen müßte. Wie aber schon TSCHERMAK-WOESS (1951) feststellte, entwickeln sich alle Embryonen normal. Diese Angaben konnten bestätigt werden und außerdem zeigte es sich, daß die Zellkerne in den Embryonen immer den vollständigen diploiden Chromosomensatz besitzen. Infolgedessen drängte sich zunächst der Schluß auf, daß die Embryonen möglicherweise im Verlauf von apomiktischen Vorgängen entstehen. Im Falle von Apomixis könnte es sich bei *Rhoeo* nur um Adventivembryonie aus einer Nuzellus- oder Integumentzelle handeln, da ja aus einem Kern des Embryosackes nie ein vollständiger Chromosomensatz hervorgehen könnte. Doch konnte weder an Hand von Mikrotom- noch von Handschnitten jemals ein Zusammenhang der zwei oder mehrzelligen Embryonen mit einer Nuzellus- oder Integumentzelle festgestellt werden. Die Embryonen entwickeln sich also offenbar aus befruchteten Eizellen und sind vom Nuzellus durch die Embryosackwand und die Reste der zugrunde gegangenen Deckzellen getrennt. Obwohl der Befruchtungsvorgang

nicht direkt beobachtet werden konnte, zeigen auch die karyologischen Verhältnisse des Endosperms, daß eine Befruchtung stattgefunden hat. Die Kerne des zunächst nukleären und erst sehr spät zellulär werdenden Endosperms sind nämlich triploid oder haben eine Chromosomenzahl die ein Vielfaches der triploiden Zahl beträgt (Bildung von Restitutionskernen).

Nach all dem kann eine Befruchtung der Eizelle nur durch eine Spermazelle mit einem Komplex erfolgen, der eine Konstitution besitzt, wie sie aus einer äqualen Non-disjunction direkt oder aus inäqualer Non-disjunction nach Abregulierung (vgl. oben) hervorgeht. Es wird also z. B. eine Eizelle mit der Konstitution 1.2, 2.3, 5.6, 7.8, 9.10, 11.12 von einer Spermazelle mit der Konstitution 3.4, 4.5, 6.7, 8.9, 10.11, 12.1 befruchtet. Es müßte also eine gerichtete Befruchtung erfolgen, wobei die Spermazelle mit ihrer Chromosomenkombination das kompensiert, was der Eizelle fehlt. Eine exakte Identifizierung der fertilen Komplexstrukturen ist vorderhand nicht möglich, so daß man nur die Möglichkeit bei der Befruchtung betrachten kann. Theoretisch gibt es bei *Rhoeo* nach äqualer Non-disjunction 30 verschiedene Kombinationen. Nach gewissen Anzeichen zu schließen, werden aber bestimmte Kombinationen bevorzugt gebildet, und zwar dürften zwei benachbarte heterobrachiale Chromosomen — entweder handelt es sich um C.c + c.D oder b.C + C.c (vgl. SAX) — obligat zu einem Pol wandern. In diesem Fall würden nur 5 Kombinationsmöglichkeiten bestehen. Daß verschiedene zusammengesetzte Komplexe funktionsfähige Embryosäcke und Pollenkörner bilden können, ist aus dem Verhalten von *Oenothera* bekannt (vgl. RENNER; SCHWEMMLE). Eine eindeutige Klärung der Verhältnisse ist allerdings nur durch das genetische Experiment zu erwarten.

In diesem Zusammenhang stellt sich weiter die Frage: Was bewirkt die alternative Anordnung oder die Non-disjunction der Chromosomen im Ring? Nimmt man an, daß die Zuordnung der Centromeren zu dem einen oder anderen Pol zufallsmäßig erfolgt, so müßten, wenn in einem Ring nur 2 Centromeren sich \pm gleichzeitig ausrichten, 50% Disjunctions- und 50% Non-disjunctions-Fälle entstehen. SWANSON (S. 495) schreibt die regelmäßige Alternativanordnung der Tatsache zu, daß alle Chromosomen im Ring ein medianes Centromer haben, wodurch den Chromosomen in der Metaphaseplatte Bewegungsfreiheit bleibt. Demnach könnten Ringe mit heterobrachialen Chromosomen keine Disjunction, sondern nur Non-disjunction haben. Dies würde mit den Verhältnissen bei *Rhoeo discolor* übereinstimmen, da *Rhoeo* Chromosomen mit submedianem oder subterminalem Centromer besitzt.

Zusammenfassung

Während des Meioseablaufs in den Embryosackmutterzellen von *Rhoeo discolor* ist die Chromosomenkonfiguration in der Metaphase I fast immer non-disjunctional, und zwar äqual oder inäqual. Infolge-

dessen entstehen „unbalancierte“ Genome; trotzdem werden funktions- und lebensfähige Gametophyten gebildet. Unabhängig von der Chromosomenkonfiguration degenerieren 75% der Dyadenzellen und nur 25% entwickeln normale Embryosäcke. Die Letalität wird teils durch einen haplophasischen Letalfaktor, teils durch physiologische Faktoren verursacht.

Der Vergleich zwischen den Verhältnissen in Mikro- und Makrosporangien ergibt, daß die Sterilität in beiden ungefähr gleich groß ist. Entgegen den bisher geäußerten Auffassungen wird die Pollensterilität vermutlich nicht durch Non-disjunction hervorgerufen; sie dürfte vielmehr auf die Wirkung eines Letalfaktors und Störungen im Zusammenhang mit der Kettenbildung beruhen.

Die Embryonen entstehen aus der befruchteten Eizelle und nicht apomiktisch. Welche Struktur die zur Befruchtung kommenden Komplexe haben, konnte nicht eindeutig geklärt werden, doch wird angenommen, daß eine gerichtete Befruchtung erfolgt, indem die Spermazellen die zum normalen diploiden Satz fehlenden Chromosomen in die Zygote einführen.

Literatur

- CARNIEL, K.: Unterschiede in der Chiasmafrequenz bei Makro- und Mikrosporenmutterzellen von *Rhoeo discolor*. Öst. bot. Z. **107**, 241—244 (1960a). — Endständige Nukleolen und Zahl der Nukleolenchromosomen bei *Rhoeo discolor*. Öst. bot. Z. **107**, 403—408 (1960b).
- DARLINGTON, C. D.: Segregation and differentiation in *Rhoeo*. 38th Annual Report 1947, John Innes Horticultural Institution, p. 21—22, 1948.
- OEHLKERS, F.: Über Chromosomenfärbungen mit Gentianaviolett. Z. Bot. **36**, 55—62 (1940).
- RENNER, O.: Die 15-chromosomigen Mutanten der *Oenothera lamarckiana* und ihrer Verwandten. Z. induct. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **83**, 1—25 (1949).
- SAX, K.: Chromosome ring formation in *Rhoeo discolor*. Cytologia (Tokyo) **3**, 36—53 (1931).
- , and E. ANDERSON: Segmental interchange in chromosomes of *Tradescantia*. Genetics **18**, 53—67 (1933).
- SCHWEMMLE, J.: Der Einfluß des Plasmas auf die Affinität zwischen Samenanlagen und Pollenschläuchen. Biol. Zbl. **71**, 487—499 (1952).
- STRAUB, J.: Untersuchungen über die zytologische Grundlage der Komplexheterozygotie. Chromosoma (Berl.) **2**, 64—76 (1941).
- SWANSON, C. P.: Cytology and Cytogenetics. Prentice-Hall, Inc. Englewood Cliffs, N.J. 1957.
- TSCHERMAK-WOESS, E.: Cytologische und embryologische Untersuchungen an *Rhoeo discolor*. Öst. bot. Z. **94**, 128—135 (1947). — Über die Sterilitätsverhältnisse und ihre Ursachen bei *Rhoeo discolor*. Öst. bot. Z. **98**, 502—505 (1951).

Dr. K. CARNIEL,
Botanisches Institut der Universität,
Wien III, Rennweg 14

Aus dem Institut für Entwicklungsphysiologie der Universität zu Köln
**ÜBER DAS MITOSEVERHALTEN IN DEN WURZELSPITZEN
VON VICIA FABA**

II. ANALYSE DER VARIABILITÄT DER MITOSEHÄUFIGKEIT*

Von

CORNELIA HARTE und IRMGARD ZINECKER-BRAUER

Mit 2 Textabbildungen

(Eingegangen am 24. Juni 1960)

A. Einleitung

Wie in der Einleitung zum I. Teil dieser Untersuchungen (ZINECKER-BRAUER 1952) dargelegt wurde, war der Ausgangspunkt die in vielen Untersuchungen gemachte Beobachtung, daß auch in Kontrollmaterial von gleich alten Wurzelspitzen von *Vicia faba*, die unter normalen und konstanten Umweltbedingungen herangezogen wurden, die Mitosehäufigkeit nicht konstant ist, sondern ziemlich starken Schwankungen unterliegt. So war die Aufgabe gestellt, den möglichen Ursachen dieser Variabilität nachzugehen. Die erste Durcharbeitung des Materials (ZINECKER-BRAUER 1952) im Hinblick auf die Gesamtvariabilität zeigte nun, daß zwischen gleichzeitig fixierten Wurzelspitzen eine unternormale Streuung vorliegt, deren Ursachen aufgeklärt werden konnten. Als Folge dieser Feststellung kommt den gesicherten Unterschieden der Mitosehäufigkeit zwischen verschiedenen Proben von je 10 Wurzelspitzen eine besondere Bedeutung zu. Nach der Prüfung der inneren Struktur der zur Untersuchung vorliegenden statistischen Masse ist jetzt darüber hinaus die Möglichkeit gegeben, im einzelnen den Ursachen für die Variabilität zwischen den Fixierungseinheiten, d. h. zu verschiedenen Fixierungszeiten, nachzugehen.

B. Material und Methode

Es handelt sich um das gleiche Material, das in Teil I bereits bearbeitet wurde. Vom 12. 7.—22. 8. 48 wurde an 42 aufeinanderfolgenden Tagen von 4—23 Uhr stündlich von je zehn 6 Tage alten Keimpflanzen die Spitze der Hauptwurzel fixiert, also 20 Fixierungen täglich. Fixierung und Färbung in Alkohol-Eisessig mit Zusatz von Karminessigsäure, Verarbeitung als Quetschpräparate. Aus jeder Wurzelspitze wurde aus der Mitte des Meristems die Mitosehäufigkeit in 100 Zellen ausgezählt.

Die Winkeltransformationen der Prozentwerte und die Gewinnung der Daten für die Varianzanalyse erfolgten mit Hilfe der elektronischen Rechenmaschine IBM 650 (Gerät der Deutschen Forschungsgemeinschaft im Institut für praktische Mathematik der Technischen Hochschule Darmstadt, Prof. WALTER). Die Programmierung und Durchführung der Berechnungen an der Maschine besorgte Herr Dr. P. IHM, Freiburg. Den Genannten sei an dieser Stelle besonders gedankt.

* Herrn Prof. Dr. F. OEHLKERS zum 70. Geburtstag gewidmet.

Tabelle 1. *Mittelwerte der Mitosehäufigkeit in 10 Wurzelspitzen*

Tage	Stunden									
	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
12. 7.	9,0	8,9	10,0	10,8	9,9	10,4	10,2	11,1	10,8	10,3
13. 7.	8,0	8,8	8,8	8,2	8,8	10,9	11,0	10,9	9,8	10,0
14. 7.	8,1	8,3	8,5	8,7	8,5	7,8	8,8	8,8	9,1	9,4
15. 7.	8,0	8,6	8,5	8,2	8,9	8,9	10,3	10,4	9,8	9,4
16. 7.	8,5	9,1	7,3	8,9	8,2	9,1	9,3	10,4	10,3	11,2
17. 7.	7,9	8,1	8,4	8,2	8,0	9,0	9,4	9,0	9,1	10,9
18. 7.	6,4	7,1	6,7	7,3	6,8	7,9	8,0	8,3	7,0	7,1
19. 7.	5,2	6,0	5,3	5,6	7,2	6,8	6,7	9,8	8,7	9,4
20. 7.	8,6	8,3	9,2	9,5	7,5	9,3	10,7	9,0	10,6	10,2
21. 7.	7,5	8,6	9,8	11,7	7,6	7,3	8,8	10,4	9,6	10,1
22. 7.	10,5	9,3	8,2	8,9	8,8	9,8	9,7	9,8	8,6	8,4
23. 7.	11,3	10,5	8,4	9,1	9,3	9,6	9,1	8,6	8,5	9,0
24. 7.	6,0	7,7	8,9	9,5	8,0	7,0	8,2	8,6	8,5	8,0
25. 7.	10,2	10,0	8,9	8,9	8,2	7,6	9,0	9,0	10,1	10,2
26. 7.	11,0	10,1	9,3	9,5	9,8	9,5	10,0	11,4	8,7	9,7
27. 7.	9,7	9,9	9,0	9,4	9,6	8,5	9,9	9,6	8,9	8,3
28. 7.	8,7	8,9	8,7	9,1	8,5	9,2	9,4	11,0	10,0	9,4
29. 7.	10,7	9,9	9,7	10,3	8,6	8,2	9,6	11,5	10,0	9,3
30. 7.	8,0	9,1	8,9	10,3	9,7	8,2	7,3	9,1	10,2	10,8
31. 7.	9,1	9,9	10,9	11,1	9,0	10,2	13,1	13,7	13,5	12,5
1. 8.	9,6	9,3	9,7	10,7	8,6	8,8	9,6	10,5	9,8	9,5
2. 8.	8,9	9,3	8,8	8,2	9,0	10,0	8,7	10,0	10,1	10,2
3. 8.	9,8	10,0	9,0	9,8	8,3	8,4	8,7	9,1	8,9	8,9
4. 8.	9,5	8,7	6,4	6,6	7,3	9,1	9,7	11,1	11,3	10,0
5. 8.	9,0	9,6	8,7	9,0	8,8	9,9	10,0	9,8	9,0	8,1
6. 8.	8,6	9,3	9,0	8,9	8,8	9,4	8,4	8,8	8,3	9,6
7. 8.	10,8	9,0	10,1	8,8	9,1	8,5	9,1	9,4	9,5	8,7
8. 8.	9,1	9,0	8,8	9,9	9,4	9,3	8,3	9,3	9,6	10,1
9. 8.	8,7	8,6	9,1	8,8	8,7	10,1	10,3	9,7	8,9	8,6
10. 8.	8,5	6,9	7,8	8,7	8,4	8,9	9,1	10,0	10,2	9,6
11. 8.	12,3	10,8	10,3	10,4	10,0	10,5	11,1	10,5	10,8	12,0
12. 8.	9,0	8,8	8,9	9,5	8,9	9,1	10,0	10,1	9,7	9,7
13. 8.	8,2	8,2	10,4	9,9	10,0	9,1	10,4	9,6	9,3	10,2
14. 8.	7,6	7,4	8,0	8,1	9,5	9,2	9,3	9,8	10,0	10,6
15. 8.	9,0	9,6	9,0	9,2	8,0	10,0	8,7	9,3	9,6	9,6
16. 8.	9,4	8,7	8,1	7,3	9,9	10,0	9,6	10,9	11,4	10,8
17. 8.	8,8	9,2	6,7	8,3	8,1	8,0	8,7	10,0	10,8	10,0
18. 8.	9,4	8,6	9,8	10,4	8,9	9,1	9,6	9,6	9,5	10,1
19. 8.	8,6	7,5	7,0	7,3	7,4	7,4	9,2	8,2	8,4	8,6
20. 8.	9,3	7,2	7,7	7,9	7,7	8,7	9,2	9,2	9,7	7,5
21. 8.	8,4	8,8	8,7	7,1	9,3	9,0	9,4	9,6	9,0	9,8
22. 8.	8,5	8,4	9,6	9,0	9,0	9,0	9,0	9,1	9,9	10,1
Mittelwert	8,89	8,81	8,69	8,98	8,67	8,97	9,40	9,86	9,66	9,66
Mediane	8,85	8,85	8,85	8,95	8,75	9,04	9,35	9,75	9,65	9,70

C. Versuchsergebnisse

I. Die Gesamtanalyse

Der Versuchsplan wurde so angelegt, daß die einzelnen Tage und Tageszeiten als experimentelle Variable angesehen und entsprechend

von *Vicia faba* (je 100 Zellen) von 4—23 Uhr an 42 Versuchstagen

Stunden										Mittelwert
14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	
10,4	9,4	11,0	9,8	9,5	10,3	10,0	9,8	8,3	10,1	10,00
8,6	9,7	9,1	10,0	9,6	10,1	9,0	8,7	7,6	8,3	9,30
10,0	9,5	8,8	8,9	8,8	8,7	8,5	8,6	8,1	8,6	8,73
8,4	7,9	9,6	11,1	10,0	10,4	8,5	9,1	9,2	8,8	9,20
9,6	8,9	8,2	8,6	8,9	11,0	8,3	7,2	7,9	8,5	8,97
8,2	7,9	8,0	8,3	8,0	8,4	8,4	8,1	8,2	9,0	8,53
6,6	6,6	7,0	6,4	6,8	6,5	7,0	6,8	6,9	7,1	7,02
8,1	7,9	8,1	6,5	6,3	7,5	6,2	5,8	6,9	9,8	7,19
9,4	7,9	8,1	8,3	7,6	8,9	8,2	9,2	7,8	8,5	8,84
10,7	10,3	8,6	7,4	6,8	8,3	8,0	7,5	7,8	8,5	8,77
8,7	10,2	9,1	8,4	8,1	8,0	8,8	9,7	9,3	8,6	9,05
8,3	8,5	10,3	10,9	9,2	8,9	7,7	8,9	8,6	8,5	9,16
7,8	5,6	8,9	9,6	7,2	7,9	8,7	7,1	7,4	7,7	7,92
9,0	9,0	10,1	9,5	8,9	9,0	8,9	10,0	8,9	9,2	9,23
9,4	9,7	9,5	9,2	8,9	9,8	8,6	8,4	8,9	10,0	9,57
8,1	8,7	8,5	8,2	9,4	8,7	9,3	7,8	7,9	8,9	8,92
10,3	10,5	10,0	9,0	8,4	8,3	8,9	9,3	8,4	9,4	9,27
8,9	8,7	9,0	8,7	10,4	9,8	8,5	9,6	8,9	9,0	9,47
10,7	9,1	9,0	8,5	9,0	8,7	8,8	9,4	8,7	8,4	9,10
10,2	10,4	10,6	11,0	9,3	9,9	9,9	9,1	9,1	9,6	10,61
9,4	9,4	9,0	9,9	8,8	9,3	8,9	8,1	8,8	8,4	9,31
9,3	9,4	9,1	8,9	8,4	9,1	8,8	9,5	8,6	9,0	9,17
9,4	9,0	9,3	10,4	10,1	9,6	8,3	8,8	8,0	8,3	9,11
8,8	9,1	9,1	10,5	12,0	13,1	9,5	9,5	9,4	10,6	9,57
8,8	8,2	8,5	8,7	9,2	8,1	8,8	7,7	8,8	8,4	8,86
8,8	8,4	9,0	8,6	8,6	8,9	9,1	8,6	9,1	9,1	8,87
9,0	8,7	9,2	9,6	8,3	9,0	9,4	9,6	8,8	8,6	9,16
9,5	9,0	8,2	8,9	8,9	8,6	8,5	8,8	9,0	8,1	9,02
8,6	8,8	8,7	8,6	8,8	9,4	8,4	8,5	8,4	8,8	8,93
9,8	8,8	9,2	8,9	8,9	8,3	8,9	9,6	9,4	8,3	8,91
12,4	13,0	10,5	10,2	10,3	11,0	11,5	11,0	11,2	10,2	11,00
8,5	8,4	8,7	9,5	9,6	8,5	8,5	8,5	7,4	8,4	8,99
9,6	8,4	10,2	9,4	9,8	9,1	8,6	9,4	8,7	8,1	9,33
9,2	8,7	7,8	8,2	8,1	7,6	7,1	7,1	8,3	7,8	8,47
9,1	9,5	9,9	9,1	8,9	8,5	8,9	9,1	8,4	8,6	9,10
11,2	8,1	8,5	9,3	8,5	8,3	9,4	8,2	8,9	7,9	9,22
7,6	7,7	8,2	8,0	9,2	10,9	8,2	8,0	8,9	7,7	8,65
9,8	9,2	9,0	9,2	9,8	10,2	9,2	9,1	9,2	8,7	9,42
8,9	8,3	9,0	7,9	9,0	9,0	8,8	7,7	8,1	7,3	8,18
9,4	9,6	8,1	8,6	8,3	8,4	8,0	7,3	7,2	8,7	8,39
8,7	8,3	7,8	6,7	8,3	6,5	9,2	8,6	8,5	9,2	8,55
9,7	9,4	8,8	8,0	7,4	7,7	7,6	8,1	8,8	10,4	8,88
9,21	8,90	8,98	8,94	8,82	9,01	8,66	8,59	8,49	8,74	
9,15	8,85	8,97	8,90	8,87	8,94	8,75	8,65	8,60	8,60	

behandelt werden können. Die Beobachtungseinheit ist dabei die einzelne Wurzelspitze. Weil die Mitosehäufigkeit in Prozent bestimmt wurde, hat jeder dieser Einzelwerte eine andere Varianz. Nach Durchführung der Winkeltransformation (MATHER 1948, FISHER und YATES

1938) erhält jeder Wert die gleiche theoretische Streuung. Damit ist eine Varianzanalyse des Versuchs möglich.

Das Material ist in Tabelle 1 zusammengefaßt. Hierin ist jeweils der Mittelwert der Mitosehäufigkeit in Prozent aus 10 Wurzelspitzen zu jeder Fixierungszeit angegeben. Jede Zeile gibt den Verlauf der Teilungsintensität im Laufe eines Tages an, während die Spalten einen Vergleich zwischen den Fixierungen zur gleichen Stunde an allen Versuchstagen ermöglichen. (Es sei erwähnt, daß für die Winkeltransformation nicht diese Zahlen, sondern die Werte der einzelnen Wurzelspitzen verwendet wurden.)

Die Berechnungen zur Varianzanalyse mit den transformierten Werten führten zur Endanalyse in Tabelle 2. Die Gesamtvariabilität läßt

Tabelle 2. Endanalyse der Mitosehäufigkeit von *Vicia faba* in 840 Fixierungen von je 10 Wurzelspitzen, berechnet nach Winkeltransformation der Einzelwerte

Variationsursache	Summe der quadratischen Abweichungen	Freiheitsgrade	$V = s^2$	V/V_{Rest}	P	$\frac{V}{V_T \times \text{Std}}$	P
Total	27 871,023	8399	3,318				
Zwischen Fixierungen	10 485,935	839	12,498	5,44	$\leq 0,01$		
Zwischen Tagen . .	4 110,850	41	100,265	43,61	$\leq 0,01$	14,89	$> 0,01$
Zwischen Stunden .	1 160,712	19	61,090	26,57	$\leq 0,01$	9,12	$> 0,01$
Wechselwirkung Tage \times Stunden .	5 214,373	779	6,693	2,91	$< 0,01$		
Zwischen Wurzelspitzen innerhalb der Fixierungen = Rest	17 385,090	7560	2,299	3,75	$< 0,01$		
In Wurzelspitzen $V\varphi$			8,210				

sich zerlegen in die beiden Komponenten „zwischen Fixierungen“ und „zwischen Wurzelspitzen innerhalb der Fixierungen“. Die erstere ist gesichert größer als die letztere und zeigt damit an, daß die einzelnen Proben von je 10 Wurzelspitzen sich in der Mitosehäufigkeit gesichert voneinander unterscheiden. Für diese Variabilität lassen sich 3 mögliche Ursachen angeben, deren Varianzen berechnet werden können, nämlich die Unterschiede zwischen den Versuchstagen, zwischen den Tagesstunden und die Wechselwirkung zwischen Tagen und Stunden.

Zur Prüfung der Signifikanz dieser Werte stehen 3 Vergleichsmöglichkeiten zur Verfügung. Zunächst können die Tages- und die Stundenvarianz mit der Wechselwirkungsvarianz verglichen werden. Dann ist die Binnenklassenvarianz als Reststreuung gegeben, und schließlich kann die Zufallsvarianz von φ , die innerhalb einer Probe von 100 Individuen (hier Zellen) gegeben ist, herangezogen werden. Der Vergleich der Restvarianz mit der Zufallsvarianz von φ ergibt $P < 0,01$. Sie ist

also gesichert kleiner. Dies bestätigt die Schlußfolgerungen aus dem I. Teil über die unternormale Streuung zwischen gleichzeitig fixierten Wurzelspitzen. Die Differenzen zwischen den Versuchstagen sind im Vergleich mit der Restvarianz gesichert, ebenso die Differenzen zwischen den einzelnen Tagesstunden. Die Varianzen für die Komponenten „Tage“ und „Stunden“ sind auch gesichert größer als die Wechselwirkungsvarianz Tage \times Stunden. Die einzelnen Versuchstage unterscheiden sich also in der mittleren Mitosehäufigkeit, und diese ist auch nicht zu allen Tageszeiten gleich. Die 42 Tagesmittel sind aus der

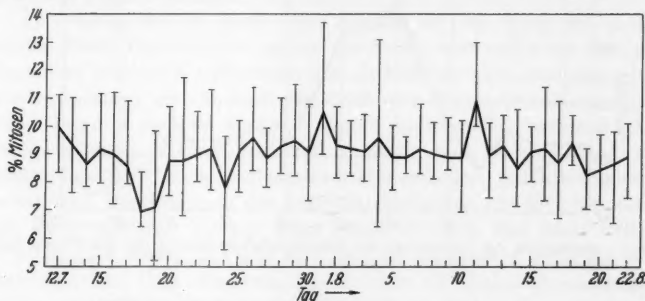


Abb. 1. Tagesmittel und Extremwerte der 42 Versuchstage

letzten Spalte der Tabelle 1 zu entnehmen und mit den Extremwerten der betreffenden Tage in Abb. 1 dargestellt. Die Variabilität der Mittelwerte zwischen den Tagen scheint etwas größer zu sein als zwischen den Stunden, aber diese Differenz ist nicht gesichert. Die Wechselwirkung Tage \times Stunden ist ebenfalls signifikant gegenüber der Restvarianz. Da eine gesicherte Wechselwirkung vorliegt, auch wenn diese nur relativ klein ist, muß das Material für eine weitere Analyse aufgegliedert werden.

II. Die mittlere Tageskurve

Die Signifikanz der Unterschiede zwischen den Tageszeiten legt den Gedanken nahe, das Material auf das Vorhandensein eines Tagesrhythmus der Mitosehäufigkeit hin zu untersuchen. Die Mittelwerte der einzelnen Stunden über alle 42 Versuchstage sind aus der untersten Zeile der Tabelle 1 zu entnehmen und in Abb. 2 dargestellt. Es zeigt sich ein deutliches Maximum der Teilungstätigkeit zwischen 11 und 13 Uhr. Die Phase des Anstiegs bzw. Absinkens ist jeweils 2 Std lang (ab 9 Uhr und bis 15 Uhr). Der weitere Verlauf der Kurve außerhalb dieses Bereiches ist unregelmäßig. Das Niveau liegt hier etwa 1% niedriger als im

Maximum, und die Differenzen in diesem Bereich sind nicht gesichert. Bei der Berechnung dieser Mittelwerte aus 42 Gruppen von je 10 Wurzelspitzen, deren Werte miteinander korreliert sind, könnte es jedoch vorkommen, daß einzelne Extreme einen relativ zu großen Einfluß erhalten.

Es ist daher besser, für die Beurteilung des Tagesgangs die Mittelwerte aus den 10 zusammengehörigen Wurzelspitzen als Beobachtungspunkte zu nehmen und aus diesen die Mediane (Zentralwert) für jede Stunde

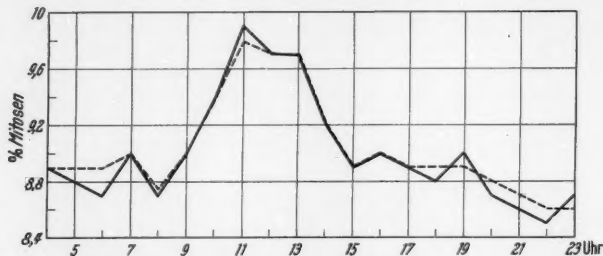


Abb. 2. Darstellung des Tagesgangs der Mitosehäufigkeit anhand der Mittelwerte und Zentralwerte der 20 Beobachtungszeiten. — Mittelwert; — — Mediane

zu bestimmen. Hierbei ist der Einfluß der Größe der Extreme ausgeschaltet. Die so gewonnene Kurve ist in Abb. 2 ebenfalls eingetragen. Sie zeigt das gleiche Maximum um die Mittagszeit, ist aber in den Morgen- und Abendstunden wesentlich ausgeglichener.

Aus der Kombination beider Kurven ergibt sich als der wahrscheinlichste Verlauf der Mitoseetätigkeit ein kontinuierlicher Anstieg in den Morgenstunden, ein breiter, 3 Std umfassender Gipfel um die Mittagszeit und ein zunächst schnelles, dann langsames Absinken gegen Abend und nachts. Dabei liegen der Endwert von 23 Uhr und der Anfangswert von 4 Uhr so, daß dazwischen ein nur wenig von diesen Punkten abweichendes Minimum, etwa um 24 Uhr, vermutet werden kann.

III. Die 42 Versuchstage

a) *Prüfung der Mittelwerte.* Die Gesamtanalyse hatte gezeigt, daß die Tage sich in der mittleren Mitosehäufigkeit gesichert unterscheiden und daß eine Wechselwirkung Tage \times Stunden gegeben ist. Der nächste Schritt muß also prüfen, wie sich diese Differenzen auf den Tagesgang der Teilungstätigkeit auswirken.

Eine Aufteilung des Materials in dieser Hinsicht führt zu 42 Kurven, von denen jede den Verlauf der Mitosehäufigkeit im Laufe eines Ver-

suchstages darstellt (Zeilen der Tabelle 1). In jeder dieser Gruppen von 20×10 Einzelwerten ist eine Varianzanalyse mit Zerlegung in die Komponenten „zwischen den Stunden“ und „zwischen Wurzelspitzen innerhalb der Stunden“ (= Rest) möglich. Die Endanalysen hierfür sind in Tabelle 3 zusammengestellt. In der überwiegenden Mehrzahl der Gruppen ist die Varianz zwischen den Stunden mit $P < 0,001$ gesichert größer als die Restvarianz, während nur an 6 Tagen für den Vergleich der beiden Komponenten $P > 0,05$ ist. Fast immer sind also gesicherte Unterschiede der Teilungshäufigkeit zwischen den Stunden auch eines einzelnen Tages vorhanden.

b) *Prüfung der Streuung.* Hier schließt sich die Frage an, ob die Größe dieser Unterschiede immer gleich ist, und somit die wenigen Tage ohne gesicherte Differenzen nur als zufällige Varianten angesehen werden müssen, oder ob auch die Größe der Tagesschwankungen von einem Tag zum anderen wechselt. Durch Addition der Summe der Abweichungsquadrate einer Varianzkomponente und Division durch die Summe der zugehörigen Freiheitsgrade läßt sich eine „mittlere Varianz“ berechnen. Der Vergleich der einzelnen Varianzen für die „Stunden“ mit ihrer mittleren Varianz zeigt 24mal $P > 0,05$ und 3mal $0,05 > P > 0,01$. An diesen 27 Tagen sind also die Differenzen zwischen dem Maximum und dem Minimum im Rahmen der Zufallsabweichungen gleich. An 9 Tagen sind dagegen die Differenzen kleiner, an 6 Tagen größer, jeweils gesichert mit $P < 0,01$, z. T. sogar mit $P < 0,001$ (Tabelle 3).

Die entsprechende Prüfung der Restvarianz zeigt, daß diese an 8 Tagen gesichert größer ist als die durchschnittliche Varianz, an 7 Tagen kleiner. Die Differenzen zwischen gleichzeitig fixierten Wurzelspitzen sind also nicht an allen Tagen gleich. Auch hierbei kommen Abweichungen in beiden Richtungen vor. Dies heißt aber, daß an manchen Tagen die verschiedenen Wurzelspitzen einheitlicher reagieren als an anderen; die Größe der theoretischen Zufallsvarianz wird aber in keinem Fall erreicht.

Die Prüfung der Korrelation zwischen der Größe der beiden Varianzkomponenten eines jeden Tages, „zwischen Stunden“ und „innerhalb der Stunden“ zeigt eine schwache Abhängigkeit beider Werte. Tage, an denen beide Werte gesichert überdurchschnittlich groß oder beide sehr klein sind, treten auffallend häufig auf. Dagegen sind Tage, an denen nur einer der beiden Werte extrem ist oder an denen beide in entgegengesetzter Richtung vom Mittel abweichen, zu selten (Tabelle 3). Die statistische Prüfung ergibt einen Korrelationskoeffizienten von $r = 0,28$ und $0,1 > P > 0,05$ für 40 Freiheitsgrade. Die Beziehung ist hier also zwar zu vermuten, aber nicht gesichert. Die genauere Betrachtung der

Tabelle 3. Endanalysen für die einzelnen Versuchstage
Für jeden Tag:Zerlegung der Freiheitsgrade: total 199 { zwischen Stunden 19
Rest 180

Tag	Varianzen		P-Werte für die Varianzvergleiche		
	Zwischen Stunden	Rest	Stunden und Rest	Stunden und mittlere Stundenvarianz	Tagesrest und mittlere Restvarianz
12. 7.	4,73	1,80	< 0,001	> 0,05 —	> 0,05 —
13. 7.	9,71	1,84	< 0,001	> 0,05 +	> 0,05 —
14. 7.	2,73	2,82	> 0,05	< 0,01 —	< 0,01 +
15. 7.	7,89	2,25	< 0,001	> 0,05 —	> 0,05 —
16. 7.	12,19	2,73	< 0,001	> 0,05 +	< 0,05 +
17. 7.	5,08	2,37	< 0,01	> 0,05 —	> 0,05 +
18. 7.	3,26	0,56	< 0,001	< 0,01 —	< 0,001 —
19. 7.	25,15	3,19	< 0,001	< 0,01 +	< 0,01 +
20. 7.	9,02	1,72	< 0,001	> 0,05 +	< 0,01 —
21. 7.	18,67	2,16	< 0,001	< 0,01 +	> 0,05 —
22. 7.	5,04	1,93	< 0,001	> 0,05 —	> 0,05 —
23. 7.	8,46	1,42	< 0,001	> 0,05 +	> 0,05 —
24. 7.	12,53	2,16	< 0,001	> 0,05 +	< 0,05 —
25. 7.	4,95	1,79	< 0,001	> 0,05 —	> 0,05 —
26. 7.	5,12	2,54	< 0,01	> 0,05 —	> 0,05 +
27. 7.	4,64	2,04	< 0,01	> 0,05 —	> 0,05 —
28. 7.	5,53	1,80	< 0,001	> 0,05 —	< 0,05 —
29. 7.	6,73	2,26	< 0,001	> 0,05 —	> 0,05 —
30. 7.	24,47	1,89	< 0,001	< 0,01 +	< 0,05 —
31. 7.	18,48	3,24	< 0,001	< 0,01 +	< 0,01 +
1. 8.	4,22	2,21	0,05—0,01	< 0,05 —	> 0,05 —
2. 8.	3,15	1,63	0,05—0,01	< 0,01 —	< 0,01 —
3. 8.	4,66	1,85	< 0,001	> 0,05 —	< 0,05 —
4. 8.	27,06	1,77	< 0,001	< 0,01 +	< 0,01 —
5. 8.	4,00	2,12	0,05—0,1	< 0,05 —	> 0,05 —
6. 8.	1,23	1,49	> 0,05	< 0,001 —	< 0,01 —
7. 8.	3,25	1,70	0,05—0,01	< 0,01 —	< 0,01 —
8. 8.	3,02	2,03	> 0,05	< 0,01 —	> 0,05 —
9. 8.	2,82	1,40	< 0,01	< 0,01 —	< 0,001 —
10. 8.	9,67	4,19	< 0,01	> 0,05 +	< 0,001 +
11. 8.	5,75	3,05	0,05—0,01	> 0,05 —	< 0,01 +
12. 8.	7,14	4,65	> 0,05	> 0,05 +	< 0,001 +
13. 8.	5,86	1,87	< 0,001	> 0,05 —	< 0,05 —
14. 8.	10,70	2,36	< 0,001	> 0,05 +	> 0,05 +
15. 8.	2,69	1,95	> 0,05	< 0,01 —	> 0,05 —
16. 8.	13,78	2,14	< 0,001	< 0,05 +	> 0,05 —
17. 8.	16,14	6,12	< 0,001	< 0,01 +	< 0,001 +
18. 8.	2,33	2,41	> 0,05	< 0,001 —	> 0,05 +
19. 8.	5,55	1,82	< 0,001	> 0,05 —	< 0,05 —
20. 8.	7,54	3,52	< 0,01	> 0,05 —	< 0,001 +
21. 8.	9,71	1,91	< 0,001	> 0,05 +	< 0,05 —
22. 8.	7,48	1,88	< 0,001	> 0,05 —	< 0,05 —
Mittlerer Wert s^2	8,38	2,30			

Daten zeigt jedoch, daß bei Abweichungen innerhalb der Grenzen $P=0,01$ keine Beziehung zwischen beiden Werten besteht, sondern daß

hier echte Zufallsschwankungen vorliegen, die bei beiden Variationsursachen unabhängig sind. Im Auftreten der extremen, nicht zufälligen Abweichungen ist dagegen die Parallelität im Verhalten der beiden Varianzen eindeutig.

Bei Betrachtung der Verteilung der Tage mit abweichender Streuung fällt auf, daß vom 6. 8. bis zum 9. 8. vier Tage mit gesichert unterdurchschnittlicher Variabilität zwischen den Stunden aufeinander folgen, wobei am ersten, zweiten und vierten Tage die Unterschiede innerhalb jeder Fixierung besonders gering sind und auch am dritten Tage unter dem Durchschnitt liegen, ebenso wie beide Varianzen am letzten Tag (5. 8.) vor

Tabelle 4. Verteilung der Maxima und Minima der Mitosehäufigkeit in Wurzelspitzen von *Vicia faba* an den 42 Versuchstagen über die 20 Stunden

Angegeben ist die Zahl der Tage, bei denen der höchste bzw. niedrigste Wert des Tages zu der betreffenden Stunde gefunden wurde. Zwei gleich große Werte, die bei den Maxima an 3 Tagen, bei den Minima an 4 Tagen auftraten, wurden mit je $\frac{1}{2}$ eingesetzt.

Tageszeit	Maxima	Minima	Tageszeit	Maxima	Minima	Tageszeit	Maxima	Minima
4	$3\frac{1}{2}$	$2\frac{1}{2}$	11	$7\frac{1}{2}$	—	18	—	3
5	$\frac{1}{2}$	$2\frac{1}{2}$	12	3	1	19	2	3
6	$\frac{1}{2}$	3	13	$8\frac{1}{2}$	—	20	—	$1\frac{1}{2}$
7	4	2	14	1	—	21	—	$5\frac{1}{2}$
8	—	4	15	1	2	22	—	$4\frac{1}{2}$
9	1	3	16	—	—	23	$1\frac{1}{2}$	2
10	$5\frac{1}{2}$	1	17	2	$\frac{1}{2}$			

dieser Serie. Die 5 Tagesmittel liegen ebenfalls sehr eng zusammen. An den ersten Tagen sind auch die Varianzen für die Unterschiede zwischen den Stunden und innerhalb jeder Fixierung gleich. Es liegt also eine Serie von 5 Tagen vor, an denen die gesamte Variabilität gegenüber dem Durchschnitt sehr stark vermindert ist. Eine entsprechende Serie mit überdurchschnittlich großen Unterschieden ist nicht vorhanden.

c) Vergleich der Kurvenform der 42 Tage. Die genauere Betrachtung der einzelnen Tageskurven zeigt darüber hinaus, daß nicht nur die Größe des Abstandes zwischen Maximum und Minimum wechseln kann, sondern daß auch die Lage der beiden Kurvenpunkte nicht immer gleich ist (Tabelle 4). Das Maximum der Mitosehäufigkeit liegt zwar meist zwischen 10 und 13 Uhr, kann aber auch in den frühen Morgenstunden auftreten. An keinem Tag liegt es jedoch zwischen 20 und 22 Uhr. Das Tagesminimum liegt fast immer entweder in den frühen Morgenstunden vor 9 Uhr oder abends nach 18 Uhr, mit besonderer Häufigkeit um 21—22 Uhr, wurde aber in einem Fall auch um 12 Uhr beobachtet, allerdings an dem Tag (6. 8.), der überhaupt die geringsten Schwankungen aufwies, wobei der Minimumwert im Zufallsbereich des Tagesmittels

liegt. In großen Zügen läßt sich der als Durchschnitt ermittelte Verlauf der Teilungshäufigkeit an allen Tagen wiederfinden, aber es sind Ausnahmen zu finden, sowohl was die Differenz der Extremwerte betrifft, wie ihr Auftreten zu bestimmten Tageszeiten.

IV. Die einzelnen Tagesstunden

Die Zerlegung in 20 Teilgruppen, von denen jede die 42 Fixierungen zu einer bestimmten Tageszeit an allen Versuchstagen umfaßt (die Spalten der Tabelle), ermöglicht einen Vergleich dieser Stundenkurven miteinander und einen Vergleich der Tageswerte innerhalb jeder Tageszeit. Für jede dieser Stundengruppen wurde eine Varianzanalyse durchgeführt, deren

Tabelle 5. *Endanalysen für die einzelnen Tagesstunden*

Zerlegung der Freiheitsgrade für jede Stunde:
total 419 { zwischen Tagen 41
 Rest 378

Stunde	Varianzen		P-Werte für die Varianzvergleiche		
	zwischen Tagen	Rest	Tage/Rest	Tage und mittlere Tagesvarianz	Stundenrest und mittlere Restvarianz
4	19,00	1,94	< 0,001	< 0,01 +	< 0,05 -
5	11,86	2,68	< 0,001	> 0,05 +	< 0,05 +
6	15,86	3,33	< 0,001	> 0,05 +	< 0,01 +
7	16,34	2,10	< 0,001	< 0,05 +	> 0,05 -
8	7,64	2,92	< 0,001	> 0,05 -	< 0,01 +
9	10,14	2,89	< 0,001	> 0,05 -	< 0,01 +
10	10,82	2,11	< 0,001	> 0,05 -	> 0,05 -
11	9,68	2,37	< 0,001	> 0,05 -	> 0,05 +
12	10,54	1,93	< 0,001	> 0,05 -	> 0,05 -
13	11,20	1,95	< 0,001	> 0,05 -	< 0,05 +
14	11,06	2,79	< 0,001	> 0,05 -	< 0,01 +
15	13,39	2,04	< 0,001	> 0,05 +	> 0,05 -
16	7,27	2,18	< 0,001	< 0,05 -	> 0,05 -
17	12,53	2,18	< 0,001	> 0,05 +	> 0,05 -
18	11,85	1,74	< 0,001	> 0,05 +	< 0,01 -
19	15,16	2,13	< 0,001	> 0,05 +	> 0,05 -
20	7,78	1,76	< 0,001	> 0,05 -	< 0,05 -
21	11,39	1,93	< 0,001	> 0,05 +	> 0,05 -
22	6,97	2,41	< 0,001	< 0,05 -	> 0,05 +
23	6,75	2,65	< 0,001	< 0,05 -	< 0,05 +
Mittlerer Wert	11,36	2,30			

„innerhalb der Tage“ mit der Restvarianz aus Tabelle 1, die die durchschnittliche Streuung zwischen gleichzeitig fixierten Wurzelspitzen wiedergibt, zeigt, daß in 4 von den 20 Stundengruppen die Restvarianz gesichert größer ist als die durchschnittliche Varianz, und in einem Fall gesichert kleiner. Außerdem liegen 5 Werte außerhalb der Grenze $P=0,05$. Es ist äußerst unwahrscheinlich, zufällig eine solche Anzahl

dieser Stundengruppen wurde eine Varianzanalyse durchgeführt, deren Endanalysen in Tabelle 5 gegeben sind. In allen Gruppen ist die Varianz „zwischen den Versuchstagen“ gesichert größer als die Restvarianz, die auch hier ein Maß für die Variabilität zwischen den Wurzelspitzen einer Fixierung darstellt.

Darüber hinaus ist aber aus derselben Tabelle noch zu entnehmen, daß die Streuung innerhalb der Proben der gleichen Stunde an verschiedenen Tagen nicht immer gleich ist. Der Vergleich der Varianzen

von Extremwerten unter 20 Fällen zu finden. Daher kann angenommen werden, daß die Schwankungen zwischen gleichzeitig fixierten Wurzelspitzen nicht zu allen Tageszeiten gleich sind. Es hat dabei den Anschein, als ob in den frühen Morgenstunden eine Neigung zu erhöhter Variabilität besteht. Parallel hierzu geht die Beobachtung, daß dies die einzige Tageszeit ist, zu der Tagesmaxima und -minima der Teilungshäufigkeit gleich oft auftreten.

Die Variabilität „zwischen den Tagen“ ist dagegen zu jeder geprüften Stunde gleich groß. Es ist nur ein Wert $P < 0,01$ vorhanden, der aber nur ein wenig außerhalb dieser Grenze liegt. Eine vereinzelte Abweichung dieser Größe kann unter 20 Fällen einmal auftreten, ohne daß deswegen eine Inhomogenität des Materials angenommen werden muß. Die Abweichungen der verschiedenen Tage vom Stundenmittel sind zu allen Tageszeiten gleich groß. Die Prüfung der Korrelation zwischen den Varianzen „zwischen den Tagen“ und „innerhalb der Tage“ ergibt keine Beziehung zwischen den beiden Werten.

D. Diskussion

I. Der Tagesgang der Mitosehäufigkeit

Die Untersuchung des Versuchsmaterials auf das Vorhandensein eines Tagesrhythmus der Teilungshäufigkeit hin führte zu interessanten Einsichten. Es bestehen gesicherte Differenzen der Mitosehäufigkeit zu den verschiedenen Tageszeiten, mit einem Maximum um die Mittagszeit und einem Minimum in den Nachtstunden. Das Niveau der Teilungsintensität, also das Tagesmittel, um das sich diese Schwankungen anordnen, liegt aber an jedem Tage anders. Das Ausmaß der Differenzen zwischen Maximum und Minimum wechselt sehr stark, und die Lage der beiden Extreme kann an einzelnen Tagen weit vom Durchschnitt abweichen. Es wurde aber keine vollständige Umkehrung der Periodizität gefunden, sondern nur eine Verschiebung der Extreme um einige Stunden oder eine völlige Abflachung der Kurve.

Die Einzelbetrachtung der Tages- und Stundenkurven bestätigte dabei die Schlußfolgerungen aus der Gesamtanalyse. Dort war auf Grund der Varianzen für die einzelnen Komponenten bereits geschlossen, daß eine Wechselwirkung Tage \times Stunden vorliegt, die aber in ihrer Bedeutung gegenüber der Differenz zwischen den Tagen und den Tageszeiten zurücktritt. Dies heißt aber, daß der Wert für die Mitosehäufigkeit, den eine Fixierung an einem Tag zu einer bestimmten Stunde ergeben hat, am gleichen Tag zu einer anderen Zeit oder an einem anderen Tag zur gleichen Zeit nicht mit Sicherheit reproduzierbar ist. Es fallen nicht nur einzelne Tage aus dem Rahmen, sondern die Werte weichen insgesamt sehr stark voneinander ab. Dieser Befund ließ sich grundsätzlich bereits

aus der Signifikanz der Wechselwirkungsvarianz entnehmen, aber diese summarische Prüfung konnte nicht zeigen, ob nur einzelne Werte als abweichend anzusehen waren, oder ob allgemein eine gleichartige Reaktion der Mitosehäufigkeit zu einer bestimmten Tageszeit fehlt.

Der große Umfang der vorliegenden Untersuchungen von 42 Tagen läßt auch erkennen, daß jede beliebige Serie von nur wenigen Tagen zu völlig falschen Schlüssen über das Auftreten oder Fehlen einer Tagesperiodizität der Teilungshäufigkeit geführt hätte. Erst durch die große Zahl von Vergleichstagen lassen sich die Gesetzmäßigkeiten und die Möglichkeiten ihrer Abwandlung erkennen.

II. Vergleich mit anderen Untersuchungen über den Tagesgang der Mitosehäufigkeit in Meristemen

In mehreren älteren und neueren Arbeiten wurde an diversen Objekten die Mitosehäufigkeit zu verschiedenen Tageszeiten untersucht (ABELE; BRAUER; BÜNNING; FRIESNER; HAGEMANN; KARSTEN 1915, 1918; KELLCOTT; LEWIS; ONO; ROTTA; STÄLFELT 1919, 1920, 1921). Die Befunde sind auf dem ersten Blick sehr widerspruchsvoll. In bezug auf das Wurzelspitzenmeristem wird sowohl das Vorliegen wie das Fehlen eines Tagesrhythmus als bewiesen angesehen. Bei näherer Betrachtung der den Schlußfolgerungen zugrunde liegenden Beobachtungsdaten zeigt sich jedoch die Ursache hierfür. Die Behauptungen sind zwar jeweils richtig, wenn sie als Beschreibung des gerade vorliegenden Materials verstanden werden, aber der Umfang dieser Beobachtungen ist nie derart, daß eine Verallgemeinerung der Schlußfolgerungen gerechtfertigt ist. Es liegt ein Zirkelschluß vor, bei dem die aus der Beschreibung der Befunde abgeleitete Hypothese zur Erklärung der gleichen Befunde verwendet wird.

In den älteren, aber auch in manchen neueren Untersuchungen fehlt naturgemäß eine variationsstatistische Bearbeitung der Auszählungen, was aber zur Folge hat, daß alle auftretenden Differenzen nur gefühlsmäßig beurteilt werden können und meist ohne weiteres als real angesehen werden. Die Behauptungen über eine Mehr Gipfeligkeit der erhaltenen Kurven halten einer statistischen Nachprüfung, die auf Grund der veröffentlichten Versuchsprotokolle nachträglich möglich ist, nicht stand (z. B. FRIESNER, Tabelle 7).

Allen früher durchgeführten Untersuchungen über tageszeitliche Differenzen der Mitoseaktivität lag, meist unausgesprochen, die Hypothese zugrunde, daß Differenzen der Mitoserate zu verschiedenen Tagesstunden entweder durch leicht erkennbare äußere Einflüsse, z. B. Temperatur oder Belichtung, hervorgerufen werden oder endogen sind, und

daß eine solche endogene Rhythmik nicht durch Umweltbedingungen unbekannter Natur abgewandelt werden kann. Auf Grund dieser Annahmen mußte gefolgert werden, daß bei Ausschaltung grober Schwankungen der Umweltbedingungen die Untersuchung eines einzigen Tages bereits eine Verallgemeinerung auf das Vorliegen oder Fehlen einer Tagesrhythmik zuläßt. Aus dieser Einstellung heraus wurde bisher eine Variabilität des Tagesgangs der Mitosehäufigkeit überhaupt nicht in Betracht gezogen und die Untersuchung entweder nur auf einen einzigen Tageszyklus beschränkt (z. B. KARSTEN; FRIESNER; HAGEMANN), oder es wurden Beobachtungen mehrerer Tage zusammengefaßt. Häufig ist sogar nicht angegeben, auf welcher Grundlage (ein Tag oder Zusammenfassung mehrerer Tage) die Kurven gewonnen wurden (z. B. BÜNNING).

Die Untersuchungen an *Vicia faba*-Wurzeln zeigen nun eindeutig, daß der Tagesgang der Mitosehäufigkeit nicht streng festgelegt ist, sondern erheblich variieren kann. Die unterschiedlichen Angaben über das Fehlen einer Periodizität oder das Auftreten von einem oder mehreren Gipfeln bei den einzelnen Objekten, soweit sie real sind, stellen also nur scheinbare Widersprüche dar, ebenso die Unterschiede in der zeitlichen Lage dieser Gipfel, die ohne Schwierigkeit als durch die Zufälligkeit des jeweiligen Untersuchungstages bedingt angesehen werden können.

Wenn die Teilungstätigkeit in Meristemen beurteilt werden soll, so handelt es sich bei dieser Fragestellung um eine Untersuchung der Variabilität der Kernteilungsrate unter dem Einfluß eines bestimmten Faktors, hier der Tageszeit. Dafür muß das Material so aufgebaut sein, daß die Methoden der Variationsstatistik angewendet werden können. Voraussetzung ist also ein gleichbleibender und ausreichender Umfang der einzelnen Stichproben, genügend Stichproben zu gleichbleibenden Zeiten je Tag und Ausdehnung der Beobachtungen über längere Zeit, um den Zufälligkeiten einer einzelnen Beobachtungseinheit (Wurzelspitzen einer bestimmten Pflanze) und eines einzelnen Versuchstages keinen Einfluß auf die Schlüsse einzuräumen. Ein ins einzelne gehender Vergleich der hier vorgelegten Befunde an *Vicia faba* mit den Verhältnissen bei anderen Objekten oder unter experimentellen Bedingungen ist demnach nicht möglich, weil kein vergleichbares Beobachtungsmaterial vorliegt, das diesen Anforderungen genügt. In der einzigen Untersuchung, die an einem etwas größerem Material durchgeführt wurde (STÄLFELT 1921 an *Pisum sativum*) wurde nicht die relative Mitosehäufigkeit in Prozent an einer Stichprobe aus dem Meristem ausgewertet, sondern die absolute Mitosenanzahl an Schnittpräparaten. Bei diesem Verfahren werden aber neben Schwankungen der Mitosenfrequenz auch noch Schwankungen der Meristemgröße erfaßt, so daß für auftretende Unterschiede nicht gesagt werden kann, ob die relative Mitosehäufigkeit in

Prozent sich geändert hat, oder ob die Größe des Meristems differierte, etwa durch Schwankungen in der Differenzierungsgeschwindigkeit am Übergang vom Meristem zur Streckungs- und Differenzierungszone.

III. Folgerungen für die Versuchsplanung von Untersuchungen über die Beeinflussung der Mitoserate

Aus diesen Ergebnissen lassen sich Folgerungen ableiten, die bei der Planung und Auswertung von Versuchen über die Beeinflussung der Mitosehäufigkeit berücksichtigt werden müssen. Eine einmalige Bestimmung eines Anfangswertes der Teilungsrates als Bezugspunkt ist nicht zulässig, weil dieser sich bereits in der nächsten Stunde verschieben kann und damit die Gefahr besteht, daß die normalen Schwankungen das Versuchsergebnis überlagern oder verfälschen, oder sogar als Versuchseinfluß gedeutet werden. Bei allen Untersuchungen über die Veränderung der Mitosehäufigkeit unter der Einwirkung irgendwelcher Faktoren muß zu jeder Versuchsfixierung gleichzeitig eine Kontrollfixierung erfolgen. Für die Beurteilung der Wirkung der Versuchsfaktoren ist dann nicht die Differenz zum Ausgangswert, sondern die Wechselwirkung zwischen Versuch und Kontrolle maßgebend. Versuche, bei denen ein exakter Vergleich besonders wichtig ist, sollten unbedingt gleichzeitig durchgeführt werden, um Wechselwirkungen zwischen den verschiedenen Versuchsbedingungen und dem durchschnittlichen Teilungsniveau verschiedener Tage auszuschalten.

Auch eine Bevorzugung der Mittagszeit als besonders günstig für Mitosebestimmungen ist nicht zu begründen. Im Durchschnitt vieler Versuchstage wird dabei zwar eine etwas höhere Mitoserate gefunden werden, aber an einem einzelnen Tag eines Versuchs braucht dies nicht der Fall zu sein, so daß die Berücksichtigung einer bestimmten Tageszeit bei langfristig laufenden Versuchen keine besonderen Vorteile bietet. Auf keinen Fall kann die Wahl eines einheitlichen Fixierungszeitpunktes für verschiedene Versuchstage die Forderung nach einem ausreichenden Kontrollmaterial für jeden Versuchspunkt überflüssig machen. Um Wechselwirkungen der unterschiedlichen Tagesschwankungen mit den Versuchsbedingungen zu erfassen, kann man jeden einzelnen Versuch klein halten, muß ihn dafür aber mehrfach wiederholen. Damit können die zufälligen Bedingungen der verschiedenen Tage zwar nicht ausgeschaltet werden, aber ihr Einfluß wird erkannt und kann bei der Deutung der Versuchsergebnisse berücksichtigt werden.

Zusammenfassung

1. In Weiterführung der Auswertung des bereits früher beschriebenen Materials wurde festgestellt, daß ein Tagesgang der Mitosehäufigkeit in den Wurzelspitzen von *Vicia faba* besteht mit einem Maximum um die Mittagszeit und einem Minimum während der Nacht.

2. Die einzelnen Tage unterscheiden sich gesichert im Niveau der durchschnittlichen Mitosehäufigkeit.

3. Es bestehen gesicherte Differenzen zwischen den Tagen sowohl in der Höhe wie in der zeitlichen Lage der Maxima und Minima der Teilungstätigkeit.

4. Der Tagesgang der Mitosetätigkeit zeigt eine erhebliche Variabilität, von Tagen mit einem deutlichen wellenförmigen Verlauf mit ausgeprägten Extremwerten bis zu völliger Abflachung der Kurve.

5. Die beiden Variabilitätskomponenten „Zwischen den Stunden eines Tages“ und „Restvariabilität eines Tages“ zeigen eine Beziehung zueinander von der Art, daß sich extreme Tage mit allgemein erhöhter oder erniedrigter Variabilität nachweisen lassen, während bei mittlerer Variabilität beide Komponenten unabhängig voneinander sind.

6. Die Einflüsse, die den Tagesgang der Mitosehäufigkeit variieren, wirken auf 3 Punkte ein: auf das durchschnittliche Niveau der Teilungsrate, auf das Ausmaß der Differenzen zwischen den Stunden eines Tages und auf die Einheitlichkeit der Reaktion der Wurzelspitzen zu einem bestimmten Zeitpunkt, wobei die beiden letzten häufig gleichsinnig verändert werden.

7. Die Variabilität zwischen den Wurzelspitzen einer Fixierungszeit zeigt gesicherte Unterschiede an den einzelnen Tagen.

8. Eine Erklärung der Befunde ist möglich durch die bereits im I. Teil ausgesprochene Annahme, daß diese noch unbekannten, variierenden Einflüsse angreifen einerseits am Vorgang der Musterbildung von antephasischen und Ruhekernzellen, indem sie entweder den Anteil der beiden Komponenten am Muster oder die Strenge, mit der das Muster aufgebaut ist, verändern, und andererseits an der Geschwindigkeit, mit der die antephasischen Zellen in die Teilung eintreten und diese durchführen, d. h. an der Teilungsrhythmik der Einzelzelle.

9. Aus den Befunden werden Folgerungen für die Planung von Versuchen über die Beeinflussung der Mitoserate abgeleitet.

Literatur

- ABELE, K.: Zur Kenntnis der Kernteilungsperiodizität in den Wurzeln von *Vicia amphicarpa* DORT. Bot. Arch. 11, 471—474 (1925).
 BRAUER, I.: Experimentelle Untersuchungen an Wurzelspitzen-Mitosen von *Vicia faba*. Planta (Berl.) 36, 411—423 (1949).
 BÜNNING, E.: Über den Tagesrhythmus der Mitosehäufigkeit in Pflanzen. Z. Bot. 40, 193—199 (1952).
 FRIESNER, R.: Daily rhythm of elongation and cell divisions in certain roots. Amer. J. Bot. 7, 380—406 (1920).
 HAGEMANN, R.: Untersuchungen über die Mitosehäufigkeit in Gerstenwurzeln. Kulturpflanze 4, 46—82 (1956).
 KARSTEN, G.: Über embryonales Wachstum und seine Tagesperiode. Z. Bot. 7, 1—34 (1915). — Über die Tagesperiode der Kern- und Zellteilungen. Z. Bot. 10, 1—20 (1918).

- KELLIKOTT, W.: The daily periodicity of cell division in the root of *Allium*. Bull. Torrey bot. Club. **31** (1904).
- LEWIS, A. C.: Contributions to the knowledge of the physiology of cargokinesis. Bot. Gaz. **32**, 423—425 (1901).
- ONO, H.: Periodicity of the nuclear divisions in *Crepis capillaris*. Tokyo Bot. Mag. 554—559 (1937).
- ROTTA, H.: Untersuchungen über tagesperiodische Vorgänge in Sproß- und Wurzelvegetationspunkten. Planta (Berl.) **37**, 399—412 (1949).
- STÄLFELT, M. G.: Über die Schwankungen in der Zellteilungsfrequenz bei den Wurzeln von *Pisum sativum*. Svensk bot. T. **13**, 61—70 (1919). — Ein neuer Fall von tagesperiodischem Rhythmus. Svensk. bot. T. **14** (1920). — Studien über die Periodizität der Zellteilung und sich daran anschließende Erscheinungen. Kgl. Svenska Vet.-Akad. Handl. **62**, 1—114 (1921).
- ZINECKER-BRAUER, I.: Über das Mitoseverhalten in den Wurzelspitzen von *Vicia faba*. I. Die Gesamtvariabilität der Mitosehäufigkeiten. Chromosoma (Berl.) **5**, 317—340 (1952).

Frau Prof. Dr. CORNELIA HARTE
Institut für Entwicklungsphysiologie,
Köln-Lindenthal, Gyrhofstr. 17

